

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA MÉDICA



BASES CLÍNICAS Y MOLECULARES PARA EL USO DE LA PENTOXIFILINA COMO TRATAMIENTO DEL ESTADO MICROINFLAMATORIO Y DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL DE PACIENTES EN DIÁLISIS

Memoria para obtener el grado de Doctor en Farmacología presenta:

LILIANA GONZÁLEZ ESPINOZA

DIRECTOR DE TESIS:

D. EN C. ABELARDO AGUILERA PERALTA

Investigador Médico de la Unidad de Biología Molecular y del Servicio de Nefrología
Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, España

TUTORES DE TESIS:

D. EN C. CONCEPCIÓN PEIRÓ VALLEJO

Profa. Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina

DR. JOSE ANTONIO SÁNCHEZ TOMERO

Jefe del Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de La Princesa

MADRID, ESPAÑA. 2012

*A mis padres Eva y Leopoldo y a Margaret, mi hermana.
A Ángel.*

Agradecimientos

Agradecimientos Profesionales.

Al **Dr. Alfonso Cueto Manzano** (Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Renales, HE, CMNO, IMSS, Gdl., Jal., México) por abrirme las puertas en la investigación clínica, dándome las bases de mi formación como investigador médico. Gracias por haber confiado en mí, por su apoyo incondicional hasta el último momento para el desarrollo del presente trabajo, ha sido fundamental en esta meta. A la **Dra. Ana Rosa Rincón Sánchez** (Coordinadora del programa educativo de Posgrado en Farmacología, UDG, Gdl., Jal., México) por haber creído en mí, por apoyarme y conducirme durante este posgrado. A ambos por convertirse en mi impulso, ejemplo y dirección durante mi estancia en el extranjero, la cual ha sido una de las experiencias más importantes en mi vida profesional.

Al **Dr. Rafael Selgas** por aceptarme como parte de su grupo de investigación [Unidad de Biología Molecular, Hospital Universitario de La Princesa (UBM, HULP), Madrid, España], en especial al **Dr. Abelardo Aguilera**, por su apoyo ilimitado. Gracias **Abelardo**, por darme las herramientas para entender la importante conjunción entre la investigación clínica y básica, por hacerme partícipe de tus proyectos, por tu paciencia y esfuerzo en el presente trabajo.

A **Dr. J.A. Sánchez Tomero y la Dra. Guillermina Barril**, por su ayuda y confianza en mí, así como a las **Enfermeras de Diálisis** (Servicio de Nefrología del HULP y del Hospital San Camilo, Madrid, España) por su gentileza para trabajar en conjunto con los enfermos renales con una excelente disposición siempre para lograr el presente trabajo.

A **Dr. Carlos F. Sánchez Ferrer y a la Dra. Concepción Peiró** y su grupo de investigación (Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España), por aceptarme en su laboratorio, por su tiempo, instrucción y conducción en la investigación básica del presente trabajo.

Muchas gracias en especial a **Paloma Sanz, Yolanda Rodríguez, Samuel Martín** (Unidad de Hepatología, HULP, Madrid, España) **Pilar Sandoval, Patricia Albar, Vicente Ruiz** (UBM, HULP, Madrid, España) y **Elena Cercas** (UAM, Madrid, España) por su

paciencia y disposición para enseñarme y ayuda inestimable durante mis inicios en la investigación básica.

También agradezco a cada uno de los biólogos de los diversos grupos de investigación de **“la 9ª”**, (HULP, Madrid, España), que me han permitido trabajar con ellos, y que desde mis inicios me han tenido mucha paciencia, aconsejándome en los experimentos y enseñándome con su propia experiencia como mejorarlos, siempre con gran disposición. Asimismo agradezco a cada uno de los integrantes de la **“Unidad”**, (UIMER, HE, CMNO, IMSS, Gdl., Jal. Méx.), que han sido unos grandes compañeros, amigos y excelentes críticos.

Agradecimientos Personales.

Finalmente dedico estas últimas líneas a los seres que más amo y que me han dado la fortaleza para continuar con mis sueños y metas, por un lado **a mi familia** que siempre han estado a mi lado, creyendo en mí, con su apoyo incondicional, a mi *madre* que ha soportado la distancia estos años para que yo cumpliera mi objetivo, por su energía, consejos y amor que siempre me ha brindado a cada paso que doy y a ti *papá*, aunque ya no te pueda ver, siempre te tendré presente en mi mente y en mi corazón y donde quiera que estés te dedico este trabajo con todo mi cariño, siempre fuiste mi ejemplo por ser un gran médico y ser humano. A mi hermana *Margaret* por sus consejos y apoyo.

Durante éste tiempo no todo fue trabajo, también conocí a una gran ser humano que me llenó de ilusión, **Ángel**, gracias por caminar a mi lado, siempre ofreciéndome tu incansable ayuda, comprensión, paciencia, convirtiéndote en mi soporte a cada momento e inyectándome siempre el positivismo para no decaer a pesar de los reveses, gracias por tu invaluable dedicación y esfuerzo, contigo las horas de trabajo han sido provechosas no solo en los experimentos si no muy amenas en las conversaciones, en nuestros planes, sin faltar las risas..., gracias por enseñarme un nuevo camino de ser feliz a tu lado. Por otro lado dedico unas líneas a la **familia Hernández Bartolomé**, que me han hecho sentir parte de ella, brindándome su apoyo y cariño en más de una ocasión, gracias por los grandes momentos compartidos.

Pido disculpas si en este momento se escapa alguien de mi mente para plasmar un agradecimiento particular, no cabe duda que son muchas las personas que contribuyen en nuestra vida para lograr nuestros objetivos, lo único que me resta decir es gracias a todos por su contribución en este trabajo, así como en mi vida personal y profesional.

“Me he dedicado a investigar la vida, y no sé por qué, ni para qué existe.”

Severo Ochoa (1905-1993). Científico Español.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	17
I. INSUFICIENCIA RENAL CRONICA TERMINAL (IRCT).....	18
II. IRCT Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR (ECV).....	20
III. ECV, ATROSCLOSIS (ATE) Y MICROINFLAMACION.....	24
IV. LA IRCT, UNA ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRONICA DE BAJO GRADO.....	48
V. ESTRATEGIAS PARA REDUCIR LA MICROINFLAMACION EN LA IRCT.....	56
VI. PENTOXIFILINA (PTX).....	60
JUSTIFICACION.....	65
OBJETIVOS.....	71
MATERIALES Y MÉTODOS.....	74
INVESTIGACION CLINICA.....	75
INVESTIGACION <i>IN VITRO</i>	86
ANALISIS ESTADISTICO.....	92
CONSIDERACIONES ETICAS.....	93
RESULTADOS.....	94
CLINICOS.....	95
<i>IN VITRO</i>	117
DISCUSIÓN.....	129
PARTE CLINICA.....	131
PARTE <i>IN VITRO</i>	156
CONCLUSIONES.....	164
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167

APÉNDICES

APÉNDICE I. Ficha Técnica Española por AGEMED.....	199
APÉNDICE II. Consentimiento informado para sujetos sanos.....	207
APÉNDICE III. Consentimiento informado para pacientes con IRCT en diálisis	210
APÉNDICE IV. Hoja de Recolección de datos clínicos y bioquímicos.....	214
APÉNDICE V. Carta de aprobación del comité de ética.....	217

PUBLICACIÓN: González-Espinoza L, Rojas-Campos E, Medina-Pérez M, <i>et al.</i> Pentoxifylline decreases serum levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and C- reactive protein in hemodialysis patients: results of randomized doble-blind, controlled clinical trial. <i>Nephrol Dial Transplant</i> 2011; [Epub ahead of print].....	218
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

ABREVIATURAS

ACE/CD143	Enzima convertidora de angiotensina
ACV	Accidente cerebrovascular
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
Ag(s)	Antígeno(s)
AGEs	Productos finales de glicosilación o glucosilación avanzada
AHSG	α -Heremans-Schmid o fetuina A
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Ang (I ó II)	Angiotensina (I ó II)
AP-1	Activador de la proteína 1
APC	Células presentadoras de Ag:
ARA II	Antagonistas de los receptores de angiotensina II
ARN	Acido ribonucleico
AT1/AT2	Receptores de Angiotensina
ATE	Aterosclerosis
ATEg	Aterogénesis
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
BIVA	Bioimpedancia eléctrica
Ca	Calcio
CAM	Moléculas de adhesión
CCR	Receptor quimioquinas
CD	Clúster de diferenciación
CD146	Derivado endotelial soluble
CD16-	Subpoblación de monocitos CD14+CD16-
CD16+	Subpoblación de monocitos CD14+CD16+
CD209	Molécula de adhesión intercelular específica de células detríticas no integrina
CD43	Sialoforina
CD45RA	Isoforma del Ag leucocitario
CE	Células endoteliales
c-HDL	Colesterol unido a lipoproteína de alta densidad
CI	Cardiomiopatía isquémica
CK	Creatincinasa
c-LDL, c-VLDL	Colesterol unido a lipoproteínas de baja y muy baja densidad

CML	Células de musculo liso
CML	Células de músculo liso
cNOS	Oxido Nitrico sintasas constitutivas
COX	Ciclo-oxigenasa
CpG	Dinucleotidos de citosina-guanina no metilados
CpG-ODNs	Oligodeoxinucleotidos
CV	Enfermedad cardiovascular
CX ₃ C	Fractalquina
CX ₃ CR1	Receptor de fractalquina
DCs	Células dendríticas
DE	Disfunción Endotelial
DEXA	Absorbancia de rayos X de energía dual
DM	Diabetes mellitus
DP	Diálisis peritoneal
DPA	Diálisis Peritoneal automatizada
DPCA	Diálisis Peritoneal continua ambulatoria
DPCC	Diálisis Peritoneal continua cíclica
DPIT	Diálisis Peritoneal intermitente tidal
EAC	Enfermedad arterial coronaria
ECs	Células endoteliales cultivadas
ECV	Enfermedad cardiovascular
EE.UU.	Estados Unidos de América
Egr-1	Factor de respuesta temprana al crecimiento
EMPs	Micropartículas endoteliales
EMR2	Factor de crecimiento epidérmico con receptor 2 parecido a la mucina
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPAC	Proteínas guanina de cambio activadas por AMPc
EPO	Eritropoyetina
ERA-EDTA	European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
ERO	Especies reactivas de oxigeno
ERPQ	Enfermedad renal poliquística
FAVI	Fístula arteriovenosa interna
FG	Filtrado glomerular

GMP	Guanidil-monofosfato
GNC	Glomerulonefritis crónica
HASMC	Células de musculo liso de aorta humana / Human Aortic Smooth Muscle Cells
Hb	Hemoglobina
HD	Hemodiálisis
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HTA	Hipertensión arterial
HUVEC	Células del cordón umbilical humano
IAM	Infarto al miocardio
IC	Insuficiencia cardiaca
ICAM-1, 2 y 3	Moléculas 1, 2 y 3 de adhesión intercelular
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
IFN γ	Interferón gamma
Ig(s)	Inmunoglobulina(s)
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IKK	Complejo I κ B quinasa
IL-	Interleuquina
ILT-4	Inmunoglobulina parecida al transcripto 4
IMC	Índice de masa corporal
iNOS	NOS inducible
INR	Ratio Internacional normalizada
iPDE	Inhibidor no específico de la fosfodiesterasa
IRC	Insuficiencia renal crónica
IRCT	Insuficiencia renal crónica terminal
ISS-ODN	Oligodeoxinucleótidos inmunoestimulatorios
Lp(a)	Lipoproteína a
LPS	Lipopolisacáridos
M ϕ	Macrófagos
MAPKs	Proteínas Quinasas Mitógeno Activadas
MCP-1 ó CCL2	Proteína 1 quimiotáctica para monocitos
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MDC8+	Antígeno MDC8+
MEK1	MAP Quinasa 1
MIP-1 β	Proteína inflamatoria del M ϕ
MMP	Metaloproteinasas de matriz extracelular:
MnSOD	superóxido dismutasa

Mos	Monocitos
MPO	Mieloperoxidasa cardiaca
MyD88	Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide
ND	Nefropatía diabética
NF-κB	Factor nuclear-kappa B
NHANES III	National Health and Nutrition Examination Survey III
NK	Células asesinas-naturales
nNOS	Sintasa neuronal del NO
NO	Oxido Nítrico
NO ₂	Nitrito
NO ₃	Nitrato
NOS	sintasa del NO
NOx	Índice NO ₂ /NO ₃
NYHA	New York Heart Association
ONOO-	Peroxinitrito
ox-LDL	Lipoproteínas de muy baja densidad oxidadas
P	Fósforo
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
Pam3Cys	S-(2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-RS)-propil)-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys-OH, trihidrochloride
PBMCs	Polimorfonucleares
PCR	Proteína C reactiva
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDTC	Pirrolidinditiocarbamato
PECAM-1 ó CD31	Molécula de adhesión celular endotelial/plaquetaria
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Quinasa de inositol trifosfato
PKA	Proteinkinasa A
PKC	Proteinkinasa C
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
ppmh	Pacientes por millón de habitantes
PSGL-1	P-selectina glicoproteína-1
PTX	Pentoxifilina
rHuEPO	Eritropoyetina recombinante humana
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
rTR	Receptores de trasplante renal

SENEFRO	Sociedad Española de Nefrología
Síndrome MIA	Malnutrición, inflamación y aterosclerosis
SLANH	Sociedad Latinoamericana de Nefrología e Hipertensión
TA	Tensión arterial
TAD	Tensión arterial diastólica
TAS	Tensión arterial sistólica
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta
TLRs	Receptores Toll-like
TM	Trombomodulina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alpha
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
TR	Trasplante renal
TRAF	Factor asociado a receptor de TNF
UF	Ultrafiltrado
USRD	United States Renal Data Systems
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

“Si he hecho descubrimientos invaluables ha sido más por tener paciencia que cualquier otro talento.”

Isaac Newton (1642-1727). Físico, matemático y astrónomo inglés.

RESUMEN

INTRODUCCION. La insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) en diálisis es un problema socio-sanitario y económico de impacto mundial por su alta prevalencia e incidencia. En los pacientes en diálisis, la prevalencia de enfermedad cardiovascular (CV) es muy elevada y la mortalidad por esta causa es 10-30 veces superior a la de la población general, a pesar de la terapia de sustitución renal. En la génesis de éste riesgo CV se ha invocado la presencia de un estado microinflamatorio vascular sistémico directamente relacionado con la aterosclerosis (ATE) acelerada. Los pacientes en diálisis con ATE frecuentemente presentan altos porcentajes de monocitos (Mos) activados CD16+, moléculas de adhesión vascular: molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), desequilibrio entre citoquinas pro-inflamatorias y antiinflamatorias, con un predominio de las primeras, disminución de la capacidad fibrinolítica, de óxido nítrico (NO) en sangre periférica y malnutrición. En estos pacientes el uso de fármacos que inhiban este fenómeno inflamatorio podría ser una herramienta útil. La Pentoxifilina (PTX) es un inhibidor no específico de la fosfodiesterasa, con propiedades anti-inflamatorias. Este fármaco reduce las concentraciones séricas de TNF- α , IL-6 y PCR en pacientes con hemodiálisis (HD), aunque este hallazgo sobre pacientes en diálisis peritoneal (DP) es desconocido.

OBJETIVOS GENERALES. Evaluar el efecto de la PTX sobre la modulación de la microinflamación sistémica y disfunción endotelial (DE) en pacientes con IRCT en diálisis y evaluar *in vitro* los mecanismos de la PTX como anti-inflamatorio y anti-DE.

MATERIALES Y MÉTODOS. Parte clínica. Ensayo cuasiexperimental (antes-después, controlado) realizado en la Unidad de Biología Molecular (UBM), Hospital Universitario de La Princesa de Madrid, España. Se estudiaron 30 sujetos con IRCT en diálisis (15 en DP y 15 en HD) molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) vs 12 controles sanos durante un periodo de 4 meses. Se incluyeron sujetos sin evidencia de enfermedad grave o inflamatoria, infecciosa, ni ingestión de medicamentos con actividad inmunosupresora y/o anti-inflamatoria; que tuvieron indicación de tratamiento con PTX y con prescripción (400 mg vía oral cada 24 hrs) por nefrólogos no relacionada con el presente estudio. A partir de los PBMCs (*Ficoll*), se separó la subpoblación de Mos CD16+ (*MiniMACS separation columns*), y se cuantificó (*Nihon Kohden*). Se midieron las concentraciones séricas de PCR con nefelometría, y mediante ELISA se determinó IL-6, TNF- α , IL-10 y Fetuina A y en sobrenadante post-cultivo de 24 h de CD16+, IL-6 y TNF- α a los 0 y 4 meses del estudio vs controles sanos sin tratamiento (0 meses). Se realizó la determinación por ELISA de las

concentraciones plasmáticas del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), de la trombomodulina (TM), la lipoproteína (a) [Lp(a)], la homocisteína (Hcy), la molécula de adhesión vascular (VCAM-1), la proteína 1 quimiotáctica para monocitos (MCP-1), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (*ELISA*) antes y después del tratamiento con PTX (0 y 4 meses) vs controles sanos sin tratamiento (0 meses). De forma aleatoria en 24 pacientes en diálisis (12 en DP y 12 en HD) vs 12 controles sanos se realizó la prueba de oclusión venosa (VO) y se determinaron las concentraciones plasmáticas pre-VO y post-VO del activador tisular del plasminógeno (t-PA) por *ELISA* y de nitrato (NO_3) por electroforesis capilar como marcadores de capacidad fibrinolítica endotelial y vasodilatadora (0 y 4 meses) vs controles sanos sin tratamiento (0 meses). **Parte *in vitro*.** Los experimentos *in vitro* se realizaron en tanto en la UBM, HULP, como en el Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Se aislaron células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) en donde se analizó la expresión de MyD88 en HUVEC sin tratar y tratadas con Tak-1 (inhibidor de NF- κ B) y con sobrenadante de CD16+ de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX y de controles sanos sin tratar (24 horas), (*western blotting*). También se aislaron células de músculo liso de aorta humana (HASMC) donde se determinó el efecto de PTX (1 y 10mg/ml) sobre las concentraciones de nitritos (NO_2) (*método Griess*), y sobre la expresión de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) (*western blotting*) utilizando como control positivo la IL-1 β (2,5, 5 y 10 ng/ml). Además se analizó el efecto de PTX (1mg/ml) sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 (*citometría de flujo*) utilizando como controles positivos la IL-1 β y TNF- α (5ng/ml).

RESULTADOS. En la muestra de sujetos en diálisis el promedio de edad fue 57.1 ± 17.9 años el sexo masculino 77,7%, (vs 49.4 ± 7.4 y 47.1% respectivamente en controles sanos), el tiempo en diálisis 5.0 ± 2.0 años y las principales causas de IRCT fueron enfermedad renal poliquística, glomerulonefritis crónica e hipertensión arterial, ninguna de las variables fueron diferentes entre grupos. Las concentraciones séricas de los marcadores de inflamación fueron significativamente mayores en ambos grupos de diálisis en comparación a sujetos sanos y fueron reducidos por PTX en ambos grupos de diálisis ($p < 0.05$): En **DP**, **TNF- α** [*basal* 11.0 (5.1-13.6) *versus final* 7.4 (5.5-9.5) pg/mL], **IL-6** [*basal* 16.6 (13.1-36.6) *versus final* 6.6 (3.8-11.9) pg/mL] y **PCR** [0.6 (0.2-1.8) *basal versus final* 0.3 (0.2-0.4) pg/mL]; En **HD**, **TNF- α** [*basal* 17.5 (11.3-30.8) *versus final* 5.9 (2.1-8.0) pg/mL], **IL-6** [*basal* 17.4 (10.3-42.7) *versus final* 12.8 (1.5-27.1) pg/mL] y **PCR** [*basal* 1.2 (0.2-1.8) *versus final* 0.5 (0.1-0.8) pg/mL]; y **controles sanos**, **TNF- α** [*basal* 2.2 (1.0-3.2) pg/mL], **IL-6** [*basal* 1.8 (1.0-2.4) pg/mL] y **PCR** [0.1 (0-0.4) *basal* pg/mL], mientras que las concentraciones séricas una de las citoquinas anti-inflamatoria: **IL-10** fueron significativamente inferiores al inicio en los pacientes en diálisis en comparación a los controles sanos: En **DP**, 10.1 (5.5-14.1); En **HD**, 7.6 (6.2-11.9) *versus controles sanos* 14.5 (13.3-18.3), y PTX incremento sus

concentraciones ($p < 0.05$) en estos pacientes al final de seguimiento: En **DP**, 13.3 (10.4-15.5); **HD**, 11.2 (9.6-16.7). Por otro lado la cuantificación celular de un marcador de inflamación más específico, los **Mos CD16+** en sangre periférica antes del tratamiento en los controles sanos fue ~ 0.6 miles/mm³ $\times 10^3$, mientras que en los pacientes en diálisis fue ~ 1.3 miles/mm³ $\times 10^3$, al final del seguimiento los pacientes en diálisis presentaron una cuantificación celular ~ 0.9 miles/mm³ $\times 10^3$, PTX disminuyó el porcentaje de CD16+ ($\sim 17\%$ a $\sim 13\%$; $p < 0.05$) respecto de la población de total de Mos en ambos grupos de diálisis, aunque no alcanzó la cifra porcentual de los controles sanos ($\sim 9\%$). En el sobrenadante de los CD16+ se observaron concentraciones iniciales mayores en **DP**, **IL-6** [619 (522-624) pg/mL] y **TNF- α** [295 (191-656) pg/mL]; y en **HD**, **IL-6** [481 (172-619) pg/mL] y **TNF- α** [471 (317-650) pg/mL]; en comparación con los **controles sanos**, **IL-6** [154 (50-439) pg/mL] y **TNF- α** [162 (90-327) pg/mL]; Después del tratamiento con PTX disminuyó la capacidad secretora de CD16+ en **DP**, de **IL-6** [176 (89-503) pg/mL, $p < 0.05$] y **TNF- α** [163 (78-466) pg/mL, $p = \text{NS}$] y en **HD** de **IL-6** [160 (84-251) pg/mL, $p < 0.05$] y **TNF- α** [187 (119-326) pg/mL, $p < 0.05$]. Antes de la intervención con PTX las concentraciones plasmáticas de algunos marcadores de DE fueron significativamente mayores en ambos grupos de diálisis que en los controles sanos. En **DP**, **HD** vs **controles sanos**: **PAI-1** [62.5 (39.2-104.7), 61.8 (40.9-82.3) *versus* 28.0 (22.9-38.7) ng/ml]; **TM** [2.5 (2.0-3.2), 2.1 (1.5-2.8) *versus* 4.8 (2.8-5.4) ng/ml]; **Lp(a)** [21.5 (19.2-25.5), 28.0 (23.2-30.7) *versus* 9.0 (8.0-12.0) mg/dl]; **Hcy** [23.3 (18.4-29.9), 34.1 (17.7-57.3) *versus* 8.1 (6.9-9.8) $\mu\text{mol/l}$]; **VCAM-1** [1400.5 (1229.0-1772.5), 1677.5 (1419.5-2200.7) *versus* 852.3 (667.0-960.0) pg/ml]; **MCP-1** [197.3 (169.1-221.5), 205.1 (182.5-227.5) *versus* 158.0 (139.0-168.0) pg/ml] y **VEGF** [41.2 (26.8-71.5), 48.7 (27.4-53.2) *versus* 32.7 (29.9-34.5) pg/ml]. A excepción de dos factores de crecimiento: el **TGF- β 1** [29.0 (20.5-33.5), 27.0 (18.2-35.2) *versus* 42.0 (37.0-47.9) ng/ml] y el **PDGF** [29.0 (20.5-33.5), 27.0 (18.2-35.2) *versus* 42.0 (37.0-47.9) pg/ml]. PTX disminuyó al final de la intervención las concentraciones plasmáticas de estos mediadores, en **HD** y en **DP**: **PAI-1** [50.0 (36.5-89.5), 42.5 (31.7-59.7) ng/ml]; **Lp(a)** [21.5 (18.0-26.2), 23.0 (21.0-28.0) mg/dl]; **Hcy** [20.0 (15.7-24.5), 20.7 (16.0-26.6) $\mu\text{mol/l}$]; **VCAM-1** [1296.5 (1185.7-1480.5), 1390.0 (1137.2-1582.5) pg/ml]; **MCP-1** [175.6 (149.70-197.7), 169.6 (153.5-191.5) pg/ml]; **VEGF** [32.6 (21.4-57.9), 38.65 (15.5-49.8) pg/ml]; y **PDGF** [1366.5 (935.2-1984.5), 1387.0 (910.0-1615.0) pg/ml]. A excepción de **TM**, [final 2.9 (2.4-3.7), 2.9 (1.9-3.3)] y **TGF- β 1** [final 32.0 (25.5-37.5), 28.0 (22.5-33.5)] donde PTX incrementó las concentraciones plasmáticas de estos marcadores. Antes de la intervención con PTX las concentraciones plasmáticas de la razón post-VO/pre-VO de dos marcadores de DE fueron significativamente menores en ambos grupos de diálisis que en los controles sanos. En **DP** y **HD** vs **controles sanos** las concentraciones fueron: **NO₃** [0.7 (0.62-1.0), 1.0 (0.8-1.4) *versus* 1.4 (1.2-1.5) ng/ml, respectivamente]; **t-PA** [1.5 (1.3-2.2), 1.6 (1.1-2.3) *versus* 2.3 (1.9-2.9) ng/ml, respectivamente], pero al final del seguimiento se incrementaron las concentraciones plasmáticas de la razón post-VO/pre-VO en **DP** y **HD**: **NO₃** [1.1 (0.8-1.5), 1.1 (0.8-1.8) ng/ml]; **t-PA** [2.1 (2.0-2.3), 2.1 (1.9-2.5) ng/ml]. *In vitro* PTX demostró un efecto antiinflamatorio en HUVEC, al disminuir significativamente la expresión de MyD88, ICAM-1 y VCAM-1, mientras que en HASMC el efecto de PTX sobre NO₂ e iNOS no fue claro.

CONCLUSIONES. PTX redujo progresiva y significativamente las concentraciones séricas de TNF- α , IL-6 y PCR y aumentó las de IL-10. También disminuyó el número de Mos proinflamatorios CD16+ en sangre periférica y su actividad, y produjo un efecto fibrinolítico, vasodilatador y modulador de otros marcadores de DE y factores de crecimiento vascular en ambos grupos de diálisis después de 4 meses de seguimiento y al compararlos con controles sanos. *In vitro* PTX tuvo un efecto anti-CAM en células HUVEC, mientras que no pareció tener efecto en las HASMC sobre iNOS y NO₂. Con los presentes hallazgos, la PTX podría ser considerada como una estrategia para modular el estado microinflamatorio frecuentemente observado en pacientes con IRCT en diálisis.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA TERMINAL

La insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) se ha convertido en los últimos años en un problema socio-sanitario importante con gran impacto mundial y su tratamiento (terapia sustitutiva renal) es una de las cargas económicas más pesadas que deben de soportar los sistemas de salud a nivel global¹⁻².

Las estimaciones procedentes de la Sociedad Latinoamericana de Nefrología e Hipertensión (SLANH), de acuerdo al registro del 2003, muestran una prevalencia media de IRCT de 450 ppmh y una incidencia de 150 ppmh³, de los cuales para el 2005 la utilización de diálisis peritoneal (DP) era hasta del 72%². El último registro de *United States Renal Data Systems* (USRDS) 2010¹, señala que hubo un incremento progresivo anual en su incidencia en Estados Unidos (EE.UU.) desde 1996, mientras que en 2007 se registró un descenso en la tasa de casos incidentes de 2.1% y de 1.1 % en 2008, correspondiendo a 350 ppmh, mientras que la tasa anual de casos prevalentes ha mantenido un constante crecimiento entre 1.9 y 2.3% desde el 2000; en 2008 a 1.699 ppmh¹. En Europa se ha observado un fenómeno similar, aunque con cierto retraso respecto a EE.UU. Los datos de la *European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association* (ERA-EDTA)⁴ también demuestran un significativo incremento en la incidencia de la IRCT en Europa. En España, según el registro 2007 de la Sociedad Española de Nefrología (SENEFRO)⁵ muestra una prevalencia de 36,388 (1009 ppmh) pacientes y una incidencia de 4,543 pacientes (125 ppmh). En España, un 86.4% de pacientes que iniciaron tratamiento sustitutivo, lo hizo en hemodiálisis mientras que un 12% en diálisis peritoneal⁵. En todo el mundo a finales del 2004 la hemodiálisis (HD) fue utilizada para tratar al 89% de los pacientes⁶.

En la epidemia de IRCT, varios factores están involucrados, incluyendo el alarmante incremento de la diabetes mellitus (DM) tipo 2 [y consecuentemente de nefropatía diabética (ND)] y de la hipertensión arterial (HTA)^{1,4}. Los anteriores problemas se asocian además con el envejecimiento de la población, según los datos de registro de la ERA-EDTA⁴, con un aumento progresivo y constante de la población mayor en las dos últimas décadas, frente a una disminución proporcional de los más jóvenes. Este problema es especialmente grave en Europa y España^{4,5}.

Está claro que hace 5 décadas el pronóstico de la IRCT cambió dramáticamente con la introducción de los procedimientos de diálisis extracorpórea y con el trasplante renal (TR). Antes de esta etapa, la IRCT evolucionaba inexorablemente hacia la muerte del paciente; no obstante, a pesar de los esfuerzos y avances realizados, estos pacientes continúan presentando una mortalidad y morbilidad significativa, casi 30 veces más alta que la de la población general (aún después de haberla ajustado por edad, sexo y presencia de DM)^{1,7}.

II. IRCT y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La asociación entre enfermedad renal y patología cardiovascular (CV) es doble: por un lado, las enfermedades del riñón contribuyen al desarrollo de la enfermedad cardiovascular (ECV) y, por otro lado, la ECV facilitan la aparición y la progresión de ciertas nefropatías. Así, mientras que determinadas alteraciones orgánicas o funcionales del riñón contribuyen al desarrollo de la HTA, ésta facilita el desarrollo de la nefrosclerosis. Por otra parte, la insuficiencia renal crónica (IRC) facilita el desarrollo de aterosclerosis (ATE), que a su vez determina la aparición de la enfermedad aterosclerótica renal, como el desarrollo de una miocardiopatía que a través de la insuficiencia cardíaca (IC), puede comprometer aún más la función renal.

El *Framingham Heart Study*^{8,9} publicó en 1999 dos análisis de una muestra de 6.233 personas, de 54 años de edad media inicial y de raza predominantemente caucásica, referentes a la prevalencia poblacional de IRC y a la incidencia de complicaciones CV y muerte en una cohorte con “IRC leve” (creatinina sérica entre 1,5 y 3 mg/dl en los varones y entre 1,4 y 3 mg/dl en las mujeres). La prevalencia de IRC fue 8,7% en varones y 8% en mujeres y se relacionó positivamente con la edad, HTA, DM y ECV. Las prevalencias de ECV global, de enfermedad coronaria, de IC y de los factores de riesgo “clásicos” fueron más elevadas en los casos con IRC. El seguimiento durante 15 años evidenció que los varones con IRC mostraron una tendencia hacia un mayor riesgo de eventos cardiovasculares y una mortalidad total más elevada con respecto al grupo control sin IRC. *Henry RMA y colaboradores*¹⁰ analizaron la mortalidad total y CV según la situación inicial de la función renal medida tanto por la creatinina sérica como por el aclaramiento de creatinina estimado por la fórmula de *Cockcroft-Gault* y por el filtrado glomerular (FG) estimado por la ecuación del *MDRD* en una muestra de 631 individuos. Durante los 10,2 años de seguimiento de este estudio se observó un aumento continuo del riesgo de muerte de origen CV asociado con el grado de función renal, de tal manera que para cada

incremento en la creatinina sérica de 5 mmol/L (aproximadamente 0,05 mg/dl) y por cada disminución del aclaramiento de creatinina estimado o del FG estimado de 5 ml/min/1,73 m² se evidenció un peor pronóstico. Cuando la función renal se valoró mediante el descenso de FG (cada 10 ml/min/1,73 m²) se observó una elevación del riesgo de eventos CV tanto de *novo* como recurrentes^{11,12}.

En resumen, diversos estudios de base poblacional han mostrado una relación entre la función renal disminuida, evaluada tanto por cifras de creatinina sérica, como aclaramiento de creatinina o por FG estimada, y la morbilidad CV y la mortalidad por cualquier causa. La principal limitación de la mayoría de estos estudios es que son análisis posteriores de bases de datos desarrolladas con otros objetivos. Sin embargo, el gran número de individuos analizados y la calidad del diseño de los estudios originales otorgan un alto nivel de evidencia a la relación entre la función renal disminuida y la morbilidad CV en la población general. Además, de los párrafos precedentes se desprende que las interrelaciones fisiopatológicas entre el riñón y el aparato CV tienden a crear círculos viciosos que agravan/perpetúan la nefropatía y la ECV cuando coinciden, y que, consecuentemente empeoran el pronóstico global del paciente.

Varios estudios epidemiológicos han mostrado que la IRCT, incluso en sus fases más incipientes, se asocia con un aumento del riesgo CV, que es igual o superior al descrito en pacientes diabéticos o con historia de infarto al miocardio (IAM)¹³. Además, la tasa de admisión hospitalaria por ECV se incrementa más en estadios más avanzados de la enfermedad (3-5 de IRCT)¹. En pacientes con DM tipo 2, falla cardíaca congestiva y estadios 3-5 de la enfermedad, la tasa de mortalidad fue 169 por 1000 pacientes-año de riesgo, comparado a 89.7 en estadio 3-5 con ninguna condición comórbida¹. Según las tasas de admisión hospitalaria por todas las causas, la ECV y la infección son 46% más altas en pacientes con IRCT que en la población general¹. En los pacientes en diálisis la prevalencia de ECV es muy elevada y la mortalidad por esta causa es 10-30 veces superior a la de la

población general¹³. Aunque el riesgo CV en pacientes con TR es inferior al de los pacientes en diálisis, éste sigue siendo superior al de la población general¹⁴.

Recientemente, se ha puesto de manifiesto que entre el 30% y el 40% de los pacientes con IRCT presentan cardiopatía isquémica en ausencia de estenosis hemodinámicamente significativa de las arterias coronarias subepicárdicas¹⁵. Los mecanismos potencialmente implicados en esta situación son dos: por una parte, las placas ateroscleróticas de los enfermos con IRCT se calcifican con mayor frecuencia que las de la población general y, además, la capa media de la pared arterial está engrosada, por acumulación de matriz extracelular, lo que incrementa el cociente grosor de la pared/diámetro de la luz¹⁶. Dichas alteraciones aumentan la rigidez de la aorta y las grandes arterias, facilitando la elevación de la presión sistólica (TAS) y la presión del pulso, lo que determina el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda y un deficiente llenado coronario durante la diástole¹⁷. Este desequilibrio entre el aumento de la masa miocárdica a perfundir y la deficiente perfusión coronaria contribuye al desarrollo de la isquemia¹⁸.

La elevada prevalencia de factores de riesgo “tradicionales” (HTA, dislipemia, tabaquismo, DM tipo 2, etc.) podría explicar el exceso de morbimortalidad CV que presentan estos pacientes¹⁹⁻²¹. Sin embargo, los estudios epidemiológicos apuntan a que este mayor riesgo CV no se explica únicamente por dichos factores, por lo que se ha invocado el papel de factores propios de la uremia (anemia, alteraciones del metabolismo calcio-fósforo, hipervolemia, etc.) y de factores o marcadores de riesgo “no tradicionales” [lipoproteína a Lp(a), hiperhomocisteinemia, generación de un estado proinflamatorio, prooxidante y protrombótico], acumulación de sustancias que alteran la función endotelial [dimetilarginina asimétrica (ADMA)] y la composición de la pared vascular [productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs)]²². Entre los factores de riesgo “no tradicionales” o emergentes, el estado de inflamación crónica tiene un papel relevante en la génesis de la ATE acelerada^{5,23-25} desde los estadios iniciales de la IRCT, así como en el desarrollo de

complicaciones CV²⁶, lo que podría explicar parcialmente las elevadas tasas de ECV en este grupo de pacientes pre-, post-diálisis y quizá post-TR^{14,27-29}.

Ante el aumento en la prevalencia e incidencia de IRCT y reconociendo a la ECV como principal causa de morbilidad y mortalidad en esta población de pacientes, se hace necesario analizar y comprender los mecanismos fisiopatológicos y moleculares en su conjunto que intervienen induciendo el daño endotelial y sus complicaciones ya conocidas, así como reconocer y manipular las posibles dianas terapéuticas en beneficio de estos pacientes.

III. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR, ATEROSCLEROSIS Y MICROINFLAMACION

La Disfunción endotelial (DE) se considera en la actualidad una de las primeras manifestaciones de la ECV y la ATE. El endotelio, es una monocapa de células que recubre la pared luminal de los vasos sanguíneos, que regula la interacción de las células y las proteínas circulantes con las células residentes en la pared vascular, y ejerce un papel central como sensor y transmisor de señales. Las células endoteliales (CE), mediante un programa de expresión génica, síntesis y procesamiento de proteínas altamente regulable, son capaces de detectar los cambios tanto físicos (estrés mecánico hemodinámico) como químicos (liberación de moléculas en su entorno) y transformarlos en respuestas funcionales adaptativas³⁰. El endotelio tiene funciones antitrombóticas (inhibe la adhesión plaquetaria y la coagulación, y regula el sistema fibrinolítico), controla la actividad de las células de músculo liso (CML) de la capa media (tono vascular/proliferación) y modula el tránsito de macromoléculas, como las lipoproteínas, y la adhesión de leucocitos [monocitos (Mos) /linfocitos T] a la pared arterial³⁰. Diversos factores pueden modificar las funciones del endotelio y provocar lo que se conoce como DE. La DE puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y al incremento de la permeabilidad vascular, y que puede facilitar el desarrollo de ATE, agregación plaquetaria y trombosis³⁰ (Figura 1).

En su asociación los factores de riesgo tanto “tradicionales y no tradicionales” suelen favorecer el desarrollo de tres importantes y frecuentes resultados clínicos: el IAM, la enfermedad vascular cerebral isquémica y la enfermedad arterial periférica, las cuales se encuentran dentro de las diez primeras causas de muerte e incapacidad mundial en edad productiva y avanzada³¹. Lo anterior genera a su vez un alto coste del manejo de la fase aguda, que se incrementa notablemente durante la fase crónica³²⁻³⁴.

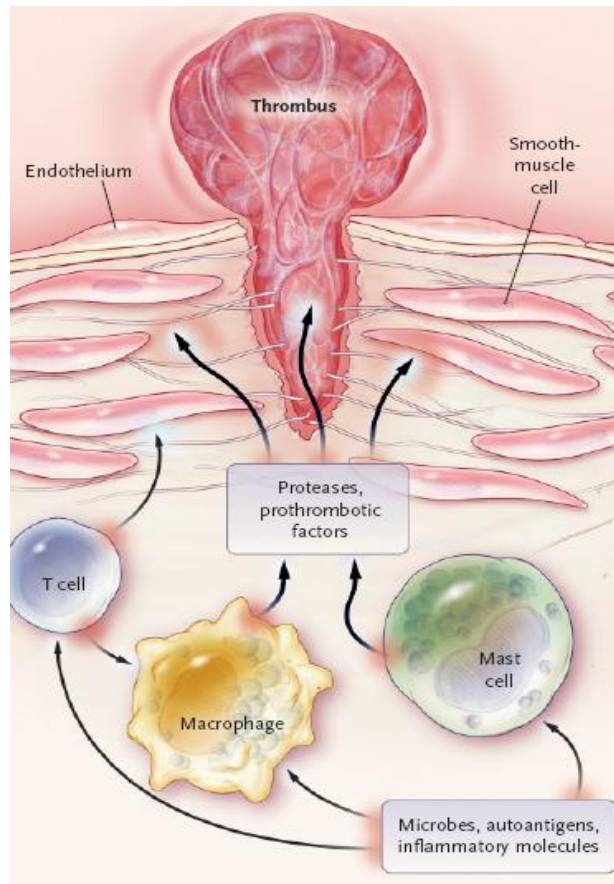


Figura 1. Lesión aterosclerótica en arteria humana
(Imagen tomada de Göran K.H., *N Engl J Med* 2005; 35(2):1685-1695)

III.a MODIFICACIONES DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR EN LA DE. El endotelio de las arterias es una monocapa celular conectada por uniones intercelulares que restringen el tráfico de macromoléculas entre la sangre y la pared vascular. Dicho proceso se realiza mediante un complejo sistema microvesicular compuesto por caveolas y un glucocálix en su superficie apical rico en glucosaminoglicanos sulfatados, que permiten la absorción selectiva de diversas macromoléculas. La pérdida paulatina de la capacidad del endotelio para controlar el tráfico de macromoléculas hacia el interior de la pared permite un mayor depósito de moléculas circulantes, iniciando el proceso de DE. Las uniones más comunes entre las CE son las uniones adherentes (*adherens junctions*) que están formadas por proteínas de adhesión transmembrana pertenecientes a la familia de las caderinas. Estas proteínas se organizan en *clusters* en los contactos entre células y, mediante su dominio

citoplasmático, se conectan con el entramado de proteínas del citoesqueleto que componen el soporte estructural del endotelio³⁵. El incremento de la permeabilidad endotelial parece vinculado con un proceso de contracción celular mediado por el calcio y con una desorganización del citoesqueleto celular. Diversos estímulos producen cambios significativos en la permeabilidad endotelial, entre ellos los protrombóticos, lipídicos y particularmente los inflamatorios son de particular importancia^{36,37}.

III.b MICROINFLAMACIÓN EN LA DE. Se cree cada vez más que la inflamación vascular sistémica de bajo grado o microinflamación en los sitios de las placas ateroscleróticas es el principal determinante tanto del inicio, la progresión, como de los resultados clínicos de la ECV³²⁻³⁵ (*Figura 2*).

La inflamación involucrada en la aterogénesis (ATEg) es mediada en gran medida por los macrófagos (MØ) derivados de los Mos, los cuales emigran de sangre periférica y se multiplican dentro de las lesiones ateroscleróticas³⁸. En la ATE, el reclutamiento de Mos en la pared vascular es crucial para la inducción y el avance de las lesiones ateroscleróticas³⁹.

Moléculas de adhesión endotelial. La activación del endotelio conlleva la expresión/secreción de citocinas, como la Interleuquina (IL)-1, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y los factores quimiotácticos (proteína 1 quimiotáctica para Mos [MCP-1 ó CCL2]), y la expresión de proteínas de superficie que actúan como moléculas de adhesión (CAM) para receptores específicos de leucocitos circulantes^{40,41}. Durante la inflamación, la atracción y migración transendotelial de los Mos a las lesiones ateroscleróticas es controlado por señales quimiotácticas, de activación y una serie de complejas interacciones entre las CAM y las citoquinas quimiotácticas expresadas por los leucocitos y células vasculares⁴².

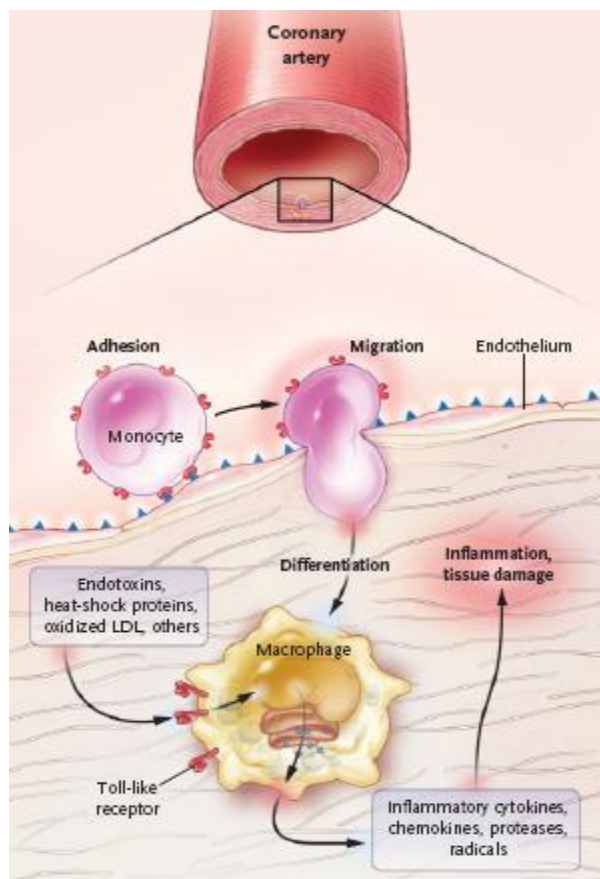


Figura 2. Microinflamación vascular

(Imagen tomada de Göran K.H., *N Engl J Med* 2005; 35(2):1685-1695)

Actualmente se conocen diversas CAM, que se agrupan fundamentalmente en dos familias: la familia de las selectinas, como la E y la P y las proteínas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs), como la molécula de adhesión vascular (VCAM-1) y las moléculas 1, 2 y 3 de adhesión intercelular (ICAM-1, 2 y 3). Las CAM actúan como ligandos de las integrinas presentes en las membranas de los leucocitos. En cultivos celulares se ha observado que las citoquinas favorecen la expresión de moléculas de adhesión, e incrementan la adhesión de Mos a las células endoteliales⁴³. Los niveles de expresión de las CAM en las lesiones ateroscleróticas son superiores a los de las áreas que no presentan ATE; esta sobreexpresión de CAM, junto con la inducción de sustancias quimioatrayentes como MCP-1, facilita la unión y la migración de los Mos en las áreas de lesión. El endotelio activado por agentes proinflamatorios y aterogénicos (citoquinas, entre

otras) expresa CAM que no se hallan presentes en el endotelio normal, como VCAM-1, y sobreexpresa otras, como ICAM-1⁴⁴. El dominio extracelular de las CAM puede liberarse al torrente circulatorio, y parece que los valores de expresión de las CAM en la superficie celular se correlacionan con los valores de sus formas solubles. Por ello, actualmente se evalúa la validez de los valores de los fragmentos solubles de estas moléculas como marcadores de evolución de las lesiones ateroscleróticas y los procesos patológicos asociados, como la DM tipo 2, la HTA y reestenosis postangioplastia. Se han encontrado valores elevados de las formas solubles de ICAM y selectina P en pacientes con cardiopatía isquémica^{45,46} y de ICAM y VCAM en pacientes con hipertrigliceridemia⁴⁷, enfermedad arteriosclerótica periférica o cerebral^{48,49}. *Ridker PM y colaboradores*⁵⁰ hace poco más de una década demostraron en el “*Physicians Health Study*” que el valor de ICAM-1 en el momento de la selección de una cohorte de cerca de 15,000 pacientes predijo el desarrollo de eventos CV a largo plazo y se correlacionó con otros marcadores de inflamación, como los valores de proteína C reactiva (PCR), dando lugar a la hipótesis de que los mediadores de inflamación tienen un papel trascendental en la aterogénesis y proveen las bases clínicas para considerar terapias anti-adhesión en la prevención de la ECV. Por otro lado, la molécula de adhesión celular endotelial/plaquetaria (PECAM-1 ó CD31), es altamente abundante en las glicoproteínas de la superficie celular expresadas sobre las células hematopoyéticas y CE, media la adhesión (PECAM-1/PECAM-1) de Mos al endotelio, donde es crítico su pasaje a través de las uniones endoteliales en la trans migración activada de citoquinas⁵¹.

*Ge-Xiu L y colaboradores*⁵² sugirieron que las lipoproteínas de muy baja densidad oxidadas (ox-LDL) podrían inducir la expresión de varias moléculas de adhesión tales como ICAM-1 y P-selectina y podrían incrementar la adhesión de Mos a células endoteliales. Mecanismo deducido indirectamente tras demostrar el efecto inhibitorio del probucol sobre la adhesión de Mos estimulados por ox-LDL, al reducir la expresión de ICAM-1 y P-selectina. Sin descartar otros mecanismos.

Interleuquina 6 (IL-6)⁵³⁻⁵⁶: Su presencia es crucial para la activación de Mos y CE. También promueve la producción de reactantes de fase aguda a nivel hepático, principalmente PCR. Altas concentraciones de IL-6, estimulan a ICAM-1, para mediar la migración de Mos a la superficie endotelial, así como incrementar la inestabilidad de la placa aterosclerótica a través de la expresión de MCP-1 y Factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α).

PCR. La PCR es el prototipo de proteína sérica reactante de fase aguda⁵⁷ y actualmente reconocida como un importante factor predictor de ECV en el humano⁵⁸. Los niveles séricos de PCR pueden incrementarse hasta 1000 veces respecto las concentraciones basales (menos de 1 μ g/ml) en respuesta a daño tisular, infección o inflamación⁵⁷. Adicionalmente la PCR tiene varias acciones funcionales con la IgG incluyendo la opsonización como activación del complemento al unirse al C1q⁵⁹. Estudios de los efectos de la PCR sobre los Mos genera cambios funcionales en la fagocitosis, induce la liberación de citoquinas y la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO)⁶⁰. Trabajos previos también han identificado que la PCR media la captación de LDL por M ϕ y el reclutamiento de los Mos en la ATEg⁶¹. En patologías asociadas con un incremento de PCR en plasma tales como ATE, un significativo número de Mos expresan en su superficie CD11b⁶². C11b, es una integrina heterodímera que media la adhesión monocítica vía ICAM-1 al endotelio, y está sobrerregulada en la superficie de Mos activados⁶³. Esto sugiere que la PCR actúa directamente sobre los Mos. *Woollard KJ y colaboradores*⁶⁴ demostraron que la capacidad de la PCR para activar los Mos humanos *in vitro* puede tener un papel, no sólo en los estados de inflamación aguda, correlacionados con el dramático incremento de los niveles de PCR si no en estadios crónicos a bajos niveles de elevación de la PCR (10 μ g/ml)⁶⁵, tales como ATE y ECV. Mientras que la PCR no promueve la adhesión de Mos a un endotelio activado precozmente, si no al activado lentamente lo cual puede ser importante en la inflamación crónica y puede jugar un papel significativo en eventos

complicados que llevan en última instancia la extravasación en los sitios de inflamación tisular⁶⁴.

Hasta ahora varias investigaciones han demostrado que las concentraciones séricas incrementadas de marcadores de inflamación tales como IL-6, TNF- α y PCR, además de ser mediadores de la ATE, también son potentes predictores de riesgo CV, y por lo tanto tienen una potencial aplicación clínica^{66,67}.

Desregulación del tono vascular en la DE. El óxido nítrico (NO) es una de las moléculas sintetizadas por el endotelio que regula un mayor número de procesos homeostáticos locales. Es generado por la NO sintasa (NOS). Existen tres isoformas de la NOS: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) y NOS inducible (iNOS); las dos primeras son llamadas constitutivas (cNOS)⁶⁸. El NO se puede clasificar como una molécula ateroprotectora de origen endotelial, vasodilatadora (vía CML), inhibidora de la adhesión y agregación plaquetaria, inhibidora de la proliferación de las CML, antioxidante (compensando los efectos del anión superóxido) e inhibidora de la expresión de las CAM y la adhesión de Mos. Por tanto, a través de la alteración de la producción de NO endotelial se perturba profundamente la homeostasis vascular y se potencia el desarrollo de lesiones ateroscleróticas⁶⁹.

La disminución de la dilatación dependiente de NO (por disminución de su bio-disponibilidad) es la manifestación más temprana de la DE. Se observa en pacientes con diversos factores de riesgo, como hipercolesterolemia, DM o homocisteinuria⁷⁰. Por el contrario, al disminuir los valores plasmáticos de LDL mediante la dieta o fármacos hipolipemiantes, se ha comprobado una mejora de la función endotelial⁷¹.

La disminución de la producción de NO por las LDL puede ser el resultado de la acción de las LDL en diferentes ámbitos:

- a) Una reducción neta de la actividad de la enzima que regula la producción de NO, la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), debido a una inhibición de los valores de ARNm y la proteína de esta enzima, como se ha observado *in vitro* en respuesta a ox-LDL⁷², y valores aterogénicos de LDL nativas⁷³.
- b) Un aumento de la fracción de eNOS unida a caveolina 1 y, por tanto, insensible a regulación por calcio-calmodulina⁷⁴;
- c) Un incremento en la degradación de NO⁷⁵, y finalmente,
- d) Un aumento de la inhibición competitiva de la formación de NO por un inhibidor endógeno (ADMA), cuyos valores se encuentran elevados en pacientes hipercolesterolémicos⁷⁶, cuyo efecto puede ser superado mediante la adición de L-arginina (el sustrato de la reacción catalizada por eNOS).

La significación *in vivo* de los diferentes efectos vinculados con una menor producción de NO se ve reforzada por la observación de una menor expresión de la enzima en arterias humanas con lesiones ateroscleróticas⁷⁷. Adicionalmente, la utilización de las propiedades antiplaquetarias del NO ha dado origen a nuevas moléculas con interesantes perspectivas en el área de la protección CV global, anti-isquémicas y anti-trombóticas⁷⁸.

El endotelio normal tiene propiedades trombocito-resistentes, es decir, no induce coagulación ni activa las plaquetas. Existe evidencia de que las CE producen prostaciclina (PGI₂), un potente inhibidor de la agregación plaquetaria. Además el NO producido por el endotelio actúa de manera sinérgica con la PGI₂ como antiagregante plaquetario. El NO inhibe la adhesión, la activación, la secreción y la agregación plaquetaria, en parte a través de un mecanismo dependiente del guanidil monofosfato (GMP)⁷⁹. Por tanto la actividad antitrombótica y anticoagulante del endotelio sano se altera en un DE, donde el balance de estas actividades puede inclinarse a favor de un estado protrombótico.

El TNF- α regula la expresión y/o la actividad de la NOS, la cual ejerce efectos directos sobre la producción de NO; por ejemplo, las CE humanas de aorta tratadas con TNF- α inducen la expresión del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de iNOS y disminuyen significativamente la expresión de eNOS en las CE⁸⁰. La iNOS es transcripcionalmente regulada y no producida normalmente en la mayoría de las células. Las especies reactivas de nitrógeno derivadas de iNOS inician un mecanismo mediado por peroxinitrito (ONOO-) y contribuye al estrés nitrativo y a empeorar la función endotelial. Se ha sugerido que el TNF- α puede incrementar la expresión de iNOS activando el NF- κ B⁸¹. El TNF- α disminuye la biodisponibilidad de NO por disminución de su producción y aumenta su eliminación^{82,83}. TNF- α juega un papel clave en la inflamación vascular de bajo grado al estimular la expresión de moléculas de adhesión, incrementando la adherencia de MoS al endotelio; también aumenta la producción de radicales libres y altera la permeabilidad del endotelio, induciendo la DE⁸⁴.

III.c HEMODINÁMICA LOCAL Y DE. Las regiones vasculares de flujo laminar uniforme parecen estar relativamente protegidas del desarrollo de lesiones. Por el contrario, las lesiones ateroscleróticas humanas se localizan de manera preferente en las bifurcaciones y curvaturas de las arterias, donde el flujo sanguíneo es lento u oscilatorio⁸⁵. Al someter a las CE a un flujo unidireccional se produce un remodelado dinámico de los sitios de contacto, que va acompañado de cambios en el estado de fosforilación de proteínas del citoesqueleto asociadas con estos sitios de unión, y con moléculas de adhesión, como la PECAM-1, que se localiza en las uniones intercelulares⁸⁶. Probablemente, estas alteraciones son el resultado de un mecanismo de adaptación al estrés mecánico que, a través de un sistema de receptores y de los sistemas de transducción de señal, permite a las CE modificar el programa génico que regula su estado funcional y adaptarlo a las condiciones de flujo. Mediante técnicas de análisis diferencial de la expresión génica se han identificado varios genes que son específicamente inducidos por el flujo laminar, como el de la ciclooxigenasa (COX)-2 y la eNOS⁸⁶. Además, el flujo modula la activación de múltiples factores de

transcripción [factor nuclear-kappa B (NF-κB)], factor de respuesta temprana al crecimiento (Egr-1, *c-jun*, *c-fos*) implicados en la activación/represión de los genes mencionados anteriormente⁸⁷. Por tanto, cada vez más parece evidente que el patrón característico de distribución de las lesiones ateroscleróticas puede explicarse, al menos en parte, por la modulación diferencial de la expresión génica que producen las condiciones reológicas dominantes en los diferentes puntos del árbol arterial.

III.d SUPERVIVENCIA/MUERTE CELULAR EN LA DE. En condiciones normales, las CE tienen un índice de recambio muy bajo, que aumenta significativamente en las zonas más vulnerables a la aparición de la lesión, en donde también se observa un mayor número de células en proceso de apoptosis. Esta observación sugiere que la apoptosis de las CE debe estar relacionada con el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. De hecho, factores proaterogénicos, como las citoquinas inflamatorias y las ERO, inducen apoptosis de las CE⁸⁸. Por el contrario, factores ateroprotectores como el NO, los antioxidantes o los estrógenos inhiben este proceso.

III.e PÉRDIDA DE INTEGRIDAD DEL ENDOTELIO Y LESIÓN VASCULAR. Aunque los mecanismos moleculares implicados en la recuperación de un endotelio funcional ante un proceso lesivo se activan de forma inmediata, la exposición de la pared desprovista de endotelio puede persistir durante varias semanas, en las que se ponen en marcha la reparación/remodelado de la pared vascular. Dicha reparación implica a las CML, que proliferan y secretan matriz extracelular⁸⁹, y a las CE, que a partir de los bordes del endotelio intacto colonizan las áreas contiguas desendotelizadas⁹⁰. La información sobre la reendotelización en pacientes es muy limitada; se considera que el proceso no tiene lugar de forma muy activa antes de 1 mes y que éste normalmente se completa al cabo de 5 meses⁹⁰. En modelos experimentales se ha observado que las áreas que se reendotelizan antes presentan un menor grado de engrosamiento intimal y proliferación de las CML.

III.f ENDOTELIO Y EXPRESIÓN GÉNICA. Los diferentes factores implicados en la DE actúan a través de receptores específicos que conducen a la activación de un reducido número de factores de transcripción implicados en la inducción/represión de los genes que determinan la activación de las CE. En últimos años se han acumulado evidencias que subrayan la relevancia del NF- κ B como común denominador en la expresión coordinada de los genes inducidos por procesos inflamatorios en la activación endotelial⁹¹. El NF- κ B fue identificado inicialmente como un factor nuclear unido al promotor de la cadena ligera *kappa* de las Igs en linfocitos B7, de donde proviene su denominación. Con posterioridad se ha descrito su presencia en casi todos los tipos celulares y está implicado en la regulación de procesos fisiológicos, como el desarrollo de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, la hematopoyesis, el control de la muerte celular o el cáncer⁹².

Estructura y Activación del NF- κ B. En los mamíferos, la forma activa de NF- κ B se presenta como un homó o heterodímero de los cinco miembros de la familia NF- κ B-Rel (*p65/Rel A*, activación intensa; *c-Rel*, activación intensa; *Rel.B*, activación moderada; *p52* (*p100/p52*), represión; y *p50* (*p105/p50*), represión) presente habitualmente de forma inactiva en el citoplasma unido a proteínas inhibitoras denominadas genéricamente I κ B. El dímero típico consiste en las subunidades p50 y p65⁹². La activación de NF- κ B puede producirse como consecuencia de una gran variedad de estímulos tanto fisiológicos como patológicos (*tabla 1*). En el momento actual se desconocen los detalles acerca de cómo esta diversidad de estímulos convergen finalmente en el NF- κ B. Se conoce con más precisión el modo de activación derivado del estímulo con citoquinas como IL-1 β y TNF- α . Sin embargo, las principales vías de activación comparten ciertas características⁹³.

Tabla 1. Estímulos de NF- κ B

- | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none">• Endotoxina (lipopolisacáridos [LPS]) // ARN bicatenario• Virus: herpes, citomegalovirus, adenovirus, hepatitis B, VIH• Estrés químico: oxidativo, osmótico (glucosa, albúmina), estrés mecánico• Mitógenos: ésteres de forbol (estímulos de PKC), suero, fitohemaglutinina, factores de crecimiento• Luz ultravioleta• Citoquinas: IL-1, IL-2, TNF-α, interferón• Proteínas de activación de membrana: moléculas de adhesión, fibronectina, CD2, CD3, CD28, $\alpha\beta$ TCR• Agentes vasoactivos: Angiotensina (Ang) II, trombina, endotelina• Matriz celular: proteoglicanos, fibronectina |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

La ruta de señalización clásica, inducida por TNF- α , IL-1 β o LPS, es un mecanismo dependiente de MyD88 y de IKK- β (IKK2), que formarían parte del complejo I κ B quinasa (IKK) junto con IKK- α (IKK1) y IKK- γ (NEMO). La señal de activación estaría mediada por IRAK/TRAFF-6 que reclutaría a la proteína quinasa TAK1, activando la fosforilación de IKK- β , que, a su vez, fosforilaría a I κ B- α provocando su ubiquitinación y degradación proteolítica del proteosoma. La liberación de NF- κ B permitiría su translocación al núcleo y la activación transcripcional de los genes diana⁹² (*Figura 3*).

Se han descrito otras formas de activaciones del NF- κ B “atípicas”, más débiles y lentas⁹⁴. En general, los estímulos proceden mediante la activación de receptores de membrana, que mediante otras proteínas adaptadoras [p. ej. factor asociado a receptor de TNF (TRAF)] activan una cascada de fosforilación de proteínas [proteínas quinasas mitógeno activadas (MAPKs)] que resulta en la activación de la quinasa responsable de la fosforilación del propio I κ B⁹⁵. Aunque el mecanismo de activación a partir de determinadas citoquinas como IL-1 β y TNF- α es bastante claro, quedan todavía muchos puntos por dilucidar. Por ejemplo, es bien conocido que en esta activación participan ERO en algún punto no determinado. Ésta es la base de la capacidad de ciertas moléculas antioxidantes para interferir con la activación de NF- κ B. Una vez en el núcleo, los diferentes dímeros de la familia NF- κ B se unen con afinidad variable a los genes correspondientes, produciendo distintos grados de transactivación. Esta variedad proporciona una sutileza adicional en la

regulación selectiva de diferentes genes en respuesta a distintos estímulos en diferentes estirpes celulares^{93,95}.

Entre los numerosos genes regulados por NF- κ B se encuentran citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8), factores estimuladores de la formación de colonias de granulocitos/macrófagos, MCP-1, factor tisular, varias moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y *c-myc* y otros genes implicados en la inflamación^{91,96}. Por tanto, la activación de NF- κ B parece ser un punto clave en la activación de múltiples efectos ligados al proceso aterosclerótico en el endotelio y en el resto de células implicadas (*Figura 3*). Asimismo, los dímeros NF- κ B no producen la transcripción de modo aislado, sino como parte de un complejo de coactivadores⁹⁷. Por otro lado, NF- κ B interactúa con otros factores de transcripción de modo positivo o negativo. Uno de ellos y que más a menudo se asocia a NF- κ B es el activador de la proteína 1 (AP-1). Tanto NF- κ B como AP-1 se activan en respuesta a ciertos estímulos proinflamatorios, pero divergen en la respuesta al estrés oxidativo, NF- κ B actúa de modo sinérgico con otros factores de transcripción como el factor nuclear IL-6 (NF-IL-6) en la estimulación de diversos genes inflamatorios (citoquinas, iNOS)⁹⁸. En sentido contrario, la interacción física de NF- κ B con otros factores de transcripción, como el receptor de glucocorticoides, impide la unión de NF- κ B al ADN, evitando la transactivación de los genes implicados⁹⁹. Este es uno de los mecanismos principales de la acción antiinflamatoria de los esteroides. Además, los esteroides estimulan la transcripción de la proteína inhibidora I κ B. De esta manera los esteroides pueden inhibir la expresión de una gran variedad de genes que carecen en su promotor de secuencias de respuesta a esteroides¹⁰⁰.

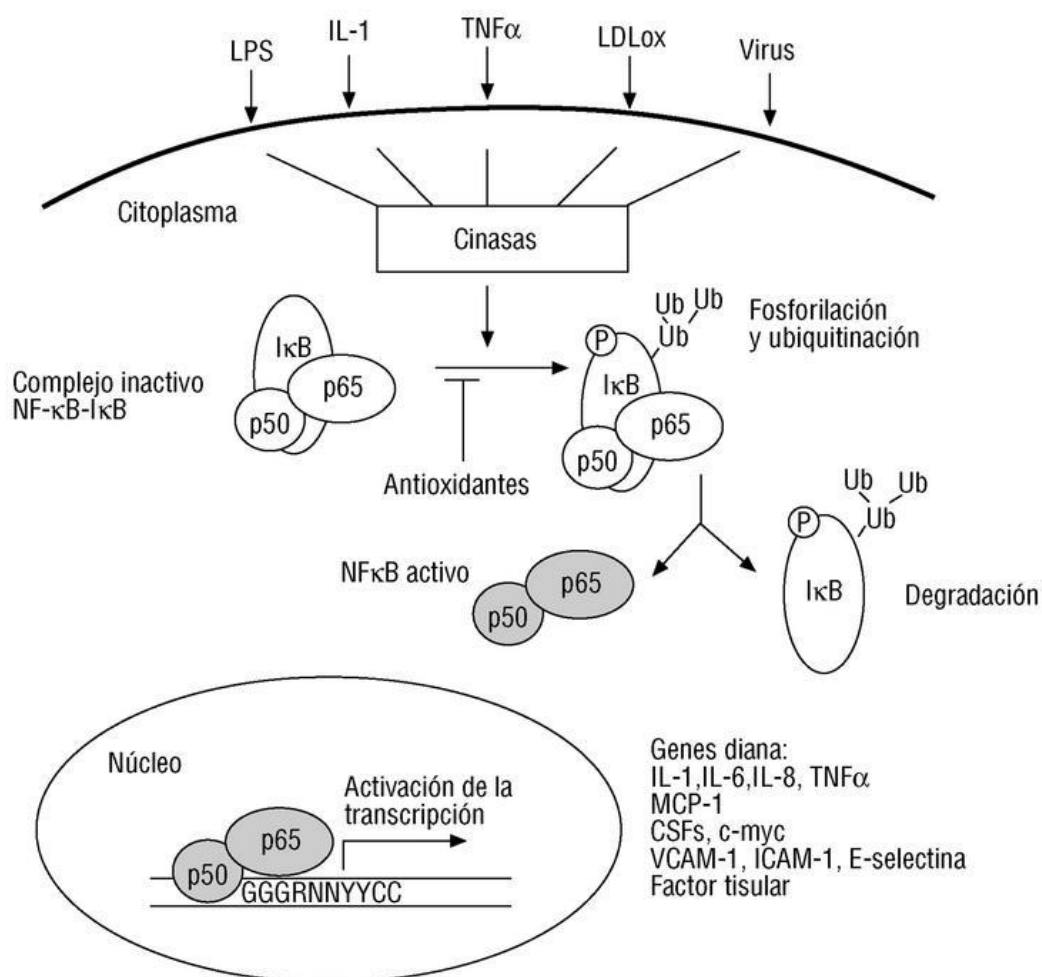


Figura 3. Activación del NF-κB por diferentes agentes y modulación por dicho factor de la expresión de diferentes genes diana.

(Imagen tomada de Martínez-González J., *Rev Esp Cardiol* 2001; 54(2):218-231)

NF-κB y ATE. Estudios *in vitro*. En el reclutamiento de moléculas inflamatorias (p. ej. quimioquinas, CAM), la proliferación celular/apoptosis, balance de coagulación/fibrinólisis y degradación de la matriz extracelular, participa el NF-κB con un papel crucial en la fisiopatología de la ATE¹⁵. Gran número de estudios *in vitro* han demostrado que diversas sustancias presentes en el microambiente de la placa ateromatosa pueden inducir la activación de NF-κB en células de la pared vascular¹⁰¹. Tanto las lipoproteínas nativas como las oxidadas en determinadas condiciones experimentales inducen la activación de NF-κB y la expresión de genes proinflamatorios por parte de CE, CML y Mos¹⁰².

Otros hallazgos recientes proporcionan una conexión molecular a la asociación epidemiológica entre hiperlipemia e HTA. Las lipoproteínas oxidadas promueven la expresión del receptor AT1 de la Ang por un mecanismo dependiente de NF- κ B, sensibilizando el árbol vascular a los efectos de la Ang¹⁰³. La estrecha relación de los mecanismos de control de presión arterial (TA) e inflamación recientemente se ha puesto de manifiesto. La Ang II promueve la activación de NF- κ B y la expresión de MCP-1 en las CML y Mos¹⁰⁴. Aunque los mecanismos moleculares por los que la Ang II induce la activación de NF- κ B no están dilucidados, parece que tanto los receptores AT1 como los AT2 pueden mediar esta activación. De este modo se ha demostrado que la activación del sistema renina-Ang puede tener un efecto proinflamatorio y, por tanto, puede producir acciones deletéreas sobre el árbol vascular más allá del aumento de la TA. La inhibición de la activación de NF- κ B por Ang con antioxidantes sugiere que las ERO están implicadas en el proceso de activación. Aunque la importancia del sistema redox en la activación de NF- κ B inducida por una gran variedad de estímulos parece clara, su evidencia es fundamentalmente indirecta. La DM es otro factor determinante en el desarrollo de lesiones aterosclerosas avanzadas. Tanto la hiperglucemia *per se* como la presencia de AGEs pueden contribuir a la activación de NF- κ B en CE y CML¹⁰⁵.

Las células de la pared vascular responden, también a factores estimuladores del crecimiento. La trombina es otra de las moléculas potencialmente importantes en el desarrollo de la ATE. Además de su acción en la coagulación, la trombina estimula la activación de NF- κ B y la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión por parte de CE y la proliferación de CML. En general, los mitógenos (trombina, Ang, factores de crecimiento) estimulan la activación de NF- κ B y la proliferación de las CML, probablemente mediante la inducción de la expresión de genes involucrados en el ciclo celular, como la ciclina D¹⁰⁶. La acumulación de CML está asimismo favorecida por el efecto antiapoptótico de la activación de NF- κ B. Aunque los mecanismos responsables del efecto antiapoptótico dependiente de NF- κ B no son bien conocidos, se ha comenzado a identificar algunos genes implicados en

esta acción¹⁰⁷. Por otro lado, algunas proteínas virales y bacterianas de agentes asociados epidemiológicamente con el desarrollo de ATE (citomegalovirus, *Chlamidia*) son, asimismo, activadoras de NF-κB¹⁰⁸.

NF-κB y ATE. Estudios *in vivo*. Mediante el empleo de anticuerpos que reconocen la forma activa de NF-κB (zona de p65 enmascarada por IκB), se ha demostrado la presencia de NF-κB activo en placas aterosclerosas humanas¹⁰⁹. Se ha detectado NF-κB activado en los núcleos de CML, CE y MØs, lo que sugiere la importancia de la citada activación en todas las estirpes celulares. Mientras que en el vaso normal, se detecta NF-κB en forma quiescente en el citoplasma de las células. De modo similar, se ha detectado la activación de NF-κB en diversos modelos experimentales de daño vascular por ATE acelerada¹¹⁰. También se ha demostrado la presencia de una marcada activación de NF-κB en las células de sangre periférica de pacientes con angina inestable, frente a la ausencia de activación en pacientes con ATE grave pero sin síndrome coronario agudo¹¹¹.

III.g SISTEMA Mos-MØ. Estas células se originan en la médula ósea, circulan por la sangre y maduran en diversos tejidos para quedar activadas. Los Mos son el primer tipo celular que entra en sangre periférica después de abandonar la médula ósea, sin haberse diferenciado por completo, hasta que han penetrado en los tejidos, éstas células maduran y se convierten en MØ, que son caracterizados por una amplia heterogeneidad fenotípica y funcional, que de acuerdo a los distintos tejidos en los que se confinan reciben nombres específicos para designar su determinada ubicación¹¹². En un modelo de tráfico transendotelial, los Mos periféricos humanos, después de iniciar la trans migración sobre la monocapa de CE, migran en dirección apical-basal para convertirse en células dendríticas (DCs), y las que permanecen en el subendotelio maduran a MØ^{113,114}. Los MØ son los mediadores más antiguos de la inmunidad innata desde el punto de vista filogenético¹¹⁵; los Mos y MØ juegan

el principal papel en la generación de la respuesta inmune y respuesta inflamatoria. Sin embargo poco se sabe acerca de las subpoblaciones de Mos de sangre periférica¹¹⁶.

Subpoblaciones de Mos. La heterogeneidad entre los Mos humanos fue reconocida hace 30 años. La identificación de diferentes subpoblaciones de Mos ha llevado a una intensa investigación para comprender la verdadera contribución de la subpoblación de Mos en las enfermedades inflamatorias¹¹⁷. La expresión diferencial entre los antígenos “*cluster of differentiation*” (CD), los CD14 (parte del receptor para LPS) y los CD16 (también conocido como Dc γ RIII) son comúnmente utilizados para definir dos de las mayores subpoblaciones en sangre periférica: los Mos “*clásicos*”: CD14+CD16- (CD16-) representan típicamente el 90-95% de los Mos en individuos sanos y los “*no clásicos*” CD14+CD16+ (CD16+) comprenden la fracción remanente (cerca del 5-10% de todos los Mos; 45 células/ μ l de sangre periférica)^{118,119}. Estas subpoblaciones tienen diferentes patrones de moléculas de adhesión y receptores de citoquinas, los cuales sugieren diferentes modos de interacción con la monocapa del endotelio y el tráfico tisular, en presencia y ausencia de citoquinas pro- y anti-inflamatorias. Actualmente se sabe que la respuesta inmune innata si tiene especificidad, si discrimina entre lo propio y lo extraño, y su activación es un prerrequisito para que se inicie la respuesta inmune adaptativa.

La primera descripción de los Mos CD16+ se remonta a 1988¹¹⁹. Son un “*pool*” de precursores circulantes, con capacidad para diferenciarse a M ϕ (barrenderos o “*scavengers*” del sistema inmune del huésped), representan una versión madura y exhiben varias características que señalan un papel importante en la generación de una reacción pro-inflamatoria inmune. Se incrementan hasta un 40% de la población total de Mos en una variedad de condiciones patógenas, incluyendo infección por VIH, enfermedad autoinmune, sepsis, tuberculosis, vasculitis sistémica, IRCT entre otras¹²⁰.

Las subpoblaciones de Mos difieren en muchos aspectos, comparados con los Mos CD16⁻. Los CD16⁺ son células senescentes con telómeros acortados versus CD16⁻¹²¹. Esta subpoblación (CD16⁺) muestra una aloreactividad superior, una capacidad aumentada para expresar antígenos (Ags) leucocitarios humanos (HLA), HLA-DR, -DP y DQ, así como para secretar altos niveles de ICAM-1, iNOS, IL-1, IL-6, TNF- α , proteína inflamatoria del M ϕ (MIP)-1 β , interferón gamma (IFN γ), factor de crecimiento epidérmico con el receptor 2 parecido a la mucina (EMR2), Ig parecida al transcripto 4 (ILT-4), sialoforina (CD43), isoforma del Ag leucocitario (CD45RA), molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas no integrinas (CD209) y MDC8⁺ (antígeno expresado ~40% de los CD16⁺, lo que podría demostrar una alta actividad APC [células presentadoras de Ag] para células T primarias) y sin embargo tienen una actividad fagocítica menor y carecen de la síntesis de IL-10. También hay una producción preferente de hemoxigenasa-1, enzima que dependiendo del sistema puede tener propiedades anti- y proinflamatorias. Mientras que los CD16⁻ liberan más IL-10¹²²⁻¹²⁴.

Asimismo, ambas subpoblaciones difieren en las moléculas de adhesión y la expresión del receptor de quimioquinas (CCR). Los CD16⁻ expresan CCR2, CD62L (L-selectina) y FC γ RI (CD64), mientras que los CD16⁺ carecen de CCR2 y tienen altos niveles de MHC-II y FC γ RII (CD32). Ambas subpoblaciones expresan el receptor de fractalquina, CX₃CR1, pero los CD16⁺ característicamente expresan niveles más altos^{125,126}. El CX₃CR1 bajo condiciones de flujo permite la detención de los Mos en las CE que expresan CX₃CL1¹²⁷. Además los CD16⁺ producen altos niveles de IL-6, CCL2 ó MCP-1 y metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP)-9 cuando son cultivadas en células HUVEC con TNF/IFN γ expresando CX₃CL1. Es posible que la membrana de CD16⁺ unida a CX₃CL1 estimule la producción de IL-6, MCP-1 y MMP9 vía CX₃CR1. Entonces la expansión de los Mos CD16⁺ y su acumulación en CE que expresen CX₃CL1 puede resultar en un reclutamiento de Mos y de células T en los sitios de inflamación¹²⁷. Cabe mencionar que

Satarikova EA y colaboradores¹²⁸ demostraron que los Mos CD16- y los CD16+ pueden ser reclutados por el endotelio inflamado, pero en ausencia de inflamación, los CD16+ se adhieren a las CE dos veces más fuertemente que los Mos CD16-. El marcado incremento de quimioquinas circulantes, como MCP-1 sérica (CCL2), podría relacionarse con el desarrollo de la ATE subclínica¹²⁹.

Como ya se aludió, los Mos son importantes elementos de defensa. Estas células pueden fagocitar material externo, presentar los Ags a células T y producir una gran cantidad de citoquinas. Es reconocido que la expresión de citoquinas en parte es ocasionada por la estimulación de productos bacterianos parecidos a LPS o *S-(2,3-bis-(palmitoiloxi)-(2-RS)-propil)-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys-OH, trihidrochloride* Pam3Cys). Tanto LPS como Pam3Cys al unirse al CD14, actúan a través del receptor Toll-like (TLR)-4 y TLR-2, respectivamente. La ligación a estos receptores permite la activación de una cascada de señales de transducción, movilización de factores de transcripción y expresión de citoquinas parecidas al TNF- α ^{130,131}. Belge KU y colaboradores¹³² analizaron la secreción de TNF- α en el sobrenadante de Mos CD16- después de la depleción de CD16+ y encontraron una reducción entre el 28 y 64% del TNF- α inducido por LPS y Pam3Cys respectivamente. Por lo que concluyeron que los Mos CD16+ son los principales productores de TNF- α en sangre periférica humana.

Los Mos y M ϕ , han sido reportadas como contribuyentes a la “inmunosenescencia” observada con la edad¹³³. Seidler S y colaboradores¹³⁴ han demostrado que existe un incremento significativo de los Mos “no clásicos” CD16+ paralelo al incremento de la edad. Sin embargo, los CD16+, se someten a cambios fenotípicos durante el envejecimiento, mostrando una reducción en los niveles de la molécula HLA-DR y en el receptor Cx₃CR1. Hallazgo relevante, ya que este receptor, ha sido implicado en promover la supervivencia de Mo/M ϕ en condiciones parecidas a la ATE¹³⁵. En este sentido, algunos informes experimentales, han demostrado que la expresión reducida de Cx₃CR1 en CD16+ parece

afectar su migración a sitios inflamatorios, así como reducir su vida media. Por tanto, el número incrementado de CD16+ no necesariamente aumenta la viabilidad y funcionalidad en las personas mayores¹³⁶. Por otro lado, al comparar las células mononucleares periféricas de sujetos sanos jóvenes (media de 26 años) con mayores (media de 80 años), la cantidad de citoquinas estudiadas en cultivos no estimulados fue similar, indicando que la maquinaria celular en la producción de citoquinas es bien preservada con la edad y que las células de gente mayor pueden sobrerregular su producción en respuesta a un apropiado estímulo. Sin embargo, las células mononucleares de personas mayores, al ser estimuladas, muestran un desbalance respecto a una incrementada producción de TNF, IL-1 β e IL-6, lo cual puede ser relevante en varios aspectos de eventos patológicos asociados a la edad (como la ATE)^{136,137}.

Existen escasos reportes de terapias que actúen directamente sobre la población de Mos pro-inflamatorias CD16+, considerándola como una importante diana terapéutica. Uno de ellos es el de *Fingerle-Rowson G y colaboradores*¹³⁸ que utilizaron los glucocorticoides por ser los más conocidos inhibidores fisiológicos de la respuesta inflamatoria y ampliamente utilizados como agentes inmunosupresores y anti-inflamatorios. Estas drogas inhiben muchos pasos en el proceso inflamatorio, p. ej. la síntesis de citoquinas tales como TNF- α , IL-1 e IL-6, expresión de moléculas de superficie celular requeridas para las funciones inmunes y migración de leucocitos en los sitios inflamados. Los resultados demostraron que los glucocorticoides, la IL-4 y la terapia exitosa en pacientes con complicaciones inflamatorias y sépticas depletan los Mos pro-inflamatorios CD16+. Además, la recuperación de la baja expresión de estas células es paralela a la mejoría clínica, por lo que el análisis seriado de los fenotipos de Mos puede ser una herramienta segura para monitorear a los pacientes que reciben tratamiento inmunosupresor o anti-inflamatorio respectivamente¹³⁹.

CD16+ y ECV. Los Mos/MØ han sido reconocidos desde hace décadas como marcadores de ATE. Como ya se ha hecho mención, los CD16+, exhiben características de células activadas, muestran alta afinidad endotelial, potente capacidad para invadir las lesiones vasculares y transformarse en MØ productores de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a estímulos de baja intensidad. Entonces, la acumulación de “Mos senescentes” puede explicar en parte, la microinflamación endotelial y la ATE subclínica en personas mayores y en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas¹⁴⁰.

Desde hace menos de una década se han seguido algunas cohortes para dilucidar el posible papel de la subpoblación de Mos pro-inflamatorios CD16+ en la ATE. Por un lado *Schlitt A y colaboradores*¹⁴¹ demostraron en una cohorte de más de 200 pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC), un incrementado porcentaje de Mos CD16+, el cual se correlacionó fuertemente con la EAC y con las concentraciones de TNF- α , después de ajustarlo a factores confusores como DM, HTA y perfil de lípidos. Esto indica que el incremento de los Mos pro-inflamatorios es un factor de riesgo independiente para EAC, y puede estar involucrado en el proceso de la enfermedad. Se ha demostrado en adición que el bloqueo de la migración de estas células a la pared vascular puede determinar la suerte de la lesión. Aún no está claro si la migración subendotelial de los Mos CD16+ contribuye al nivel de infiltración de MØ en la placa aterosclerótica.

Recientemente, *Barisione C y colaboradores*¹⁴² demostraron que la frecuencia de CD16+ y las concentraciones de la enzima convertidora de Ang (CD143 o ACE) estaban incrementadas y fueron reflejo de la enfermedad y del deterioro cardiaco progresivo en una cohorte de 30 pacientes con falla cardiaca congestiva *versus* 26 sujetos sanos.

En pacientes con DM y ECV, existe una expresión intensificada de Mos CD16+, que se correlaciona positivamente con las concentraciones séricas de PCR y con los lípidos e

inversamente con los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) colesterol¹⁴³. La ATE ha sido vinculada con un perfil de lípidos alterado y más recientemente con la inflamación de la pared arterial. En los estadios tempranos de la enfermedad, las lesiones ateroscleróticas muestran un infiltrado inflamatorio en el cual predominan los MØs, que expresan CD16+^{144,145}.

*Rouzaud A y colaboradores*¹⁴⁶ encontraron que los Mos CD16+ expresan altos niveles de RNAm de iNOS y exhiben signos apoptóticos. Al parecer el estrés oxidativo durante la reperfusión de la isquemia está asociado con el predominio fenotípico de los Mos CD16+ resultando en una inmunidad alterada y en el desarrollo de falla orgánica. *Cuschieri J*¹⁴⁷ señaló que las alteraciones en la expresión de CD16 pueden ocurrir como resultado de los cambios en la arquitectura del citoesqueleto debidas al flujo de calcio, lo que resulta de la cantidad de alteraciones lipídicas y no sólo de la producción de Mos derivada de la médula ósea.

Receptores Toll-like (TLRs) y Mos. Los TLRs, se identificaron en 1997; los miembros de esta familia de receptores, por un lado son responsables del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos¹⁴⁸, e interesantemente, por otro lado, una gran cantidad de pruebas derivadas de hallazgos experimentales, clínicos y epidemiológicos, demuestran que la activación de TLRs contribuye al inicio, desarrollo y progresión de la ATE^{149,150}. Al menos 10 TLRs han sido identificados en humanos, y entre ellos, TLR-4 es expresado por una variedad de tipos celulares tales como CD209, Mos y MØ. *Yang J y colaboradores*¹⁵¹ encontraron que la expresión de TLR-4 en linfocitos y neutrófilos fue mínima, en comparación a los Mos donde se expresó principalmente. (*Figura 5*)

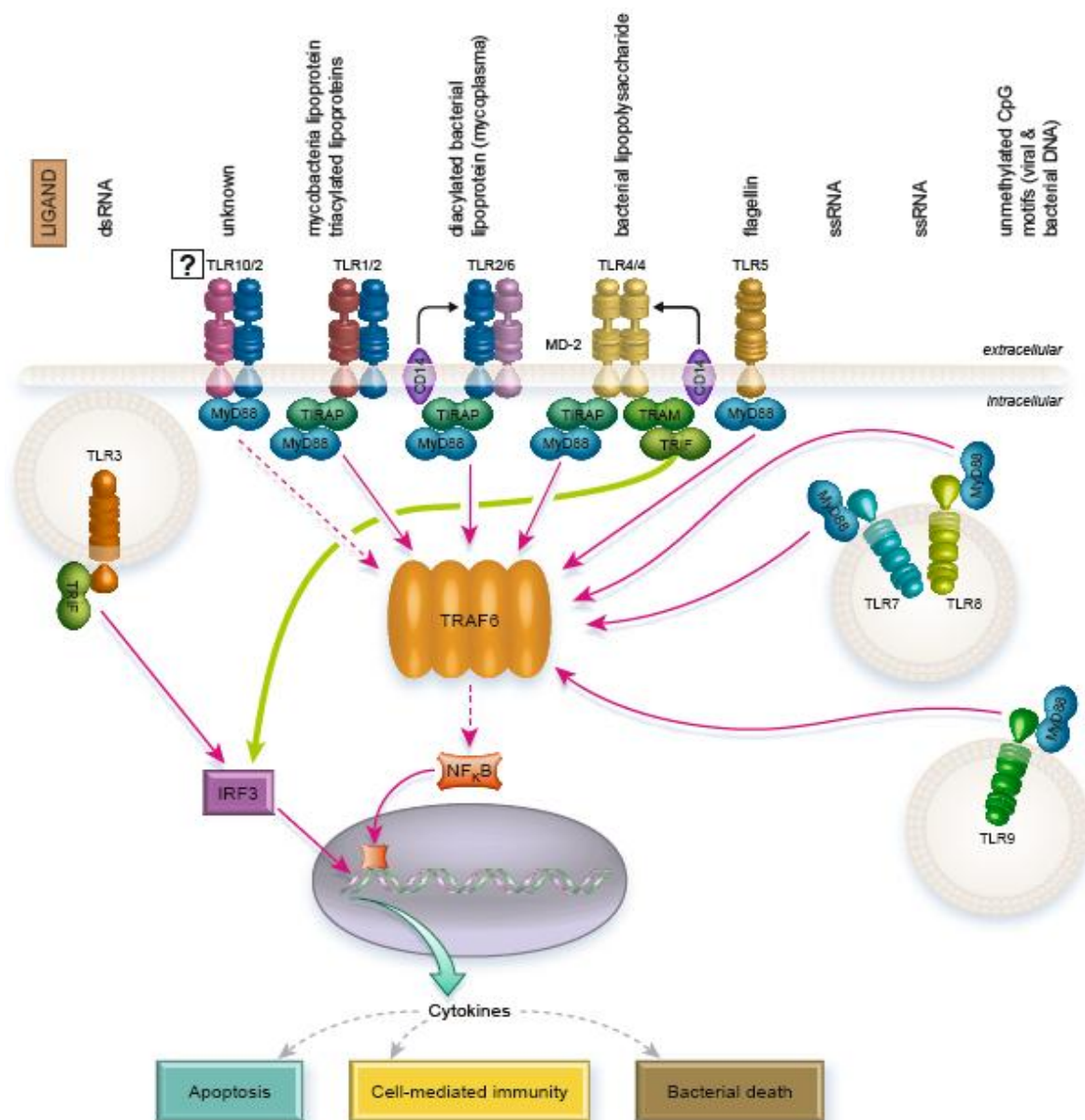


Figura 4. Vías de Señalización de los Receptores Toll-like (TLRs)

Estudios previos se han centrado en el papel de TLR-4 como ligando para LPS, sin embargo, en años recientes, la relación entre TLR-4 y enfermedades no infecciosas se ha convertido en un emocionante tema de investigación¹⁵². TLR-4 es un mediador central de la inflamación y del daño orgánico¹⁵³. De hecho, este es sobreexpresado en CE de arterias ateroscleróticas¹⁵⁴. TLR-4 podría ser activado por algunas moléculas endógenas y ligandos para el receptor, o moléculas estresantes tales como la proteína de shock térmico, heparina, ácido hialurónico, fibronectina, matriz extracelular, entre otras que inicien una respuesta

inflamatoria en ausencia de patógenos¹⁵⁵. Cada vez más, los estudios demuestran que el TLR-4 se asocia con la producción de citoquinas inflamatorias^{156,157}, tales como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8¹⁵⁸. *Ishikawa Y y colaboradores*¹⁵⁹ encontraron que el incremento en la expresión de TLR-4 en Mos obtenidos de pacientes con IAM, no fue sólo en la circulación sistémica sino también en el sitio de ruptura de la placa. *Methe H y colaboradores*¹⁶⁰ además confirmaron que el aumento en la expresión de TLR-4 de los Mos circulantes se asoció con la elevación TNF- α .

El fenómeno microinflamatorio vascular sistémico que comúnmente presentan los sujetos con IRCT, se caracteriza por un incremento de moléculas proinflamatorias circulantes por falta de excreción renal, de eliminación por los métodos actuales de diálisis y por hiperproducción por tejidos y células estimuladas por factores endógenos y exógenos. No obstante, es indudable que existe un predominio funcional de los marcadores proinflamatorios con sus consecutivas complicaciones CV. Esto sugiere que los mecanismos anti-inflamatorios incluyendo la liberación de la IL-10 pueden neutralizar los efectos de las citoquinas pro-inflamatorias, sin embargo, la elevada variabilidad interindividual medida por la heterogenicidad genética puede interferir en el resultado final del balance inflamación – anti-inflamación, p.ej. el promotor del gen de la IL-10 se ha asociado a una menor tasa de eventos y mortalidad CV¹⁶¹.

IV. LA IRCT, UNA ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA DE BAJO GRADO

En los últimos años han aparecido numerosas evidencias que relacionan a la IRCT con la presencia de microinflamación vascular sistémica, considerándola una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado *per se*, y constituyendo un factor de riesgo CV independiente^{23,162-165}. Lo anterior, sin contemplar que la mayor parte de las veces coincide con otras patologías crónicas (como la HTA y la DM tipo 2, entre otras) con las mismas características desde el punto de vista inmunológico, que potencian la presencia de dicho status¹⁶⁵. En la IRCT, la microinflamación se ha propuesto como un mecanismo productor de DE y ATE al tener una prevalencia entre el 30 y 50% en estos pacientes desde antes de iniciar diálisis. Se ha informado un incremento en las concentraciones séricas de PCR e IL-6 en comparación con sujetos sanos^{164,165}, lo cual ha sido atribuido a factores propios de un ambiente urémico hostil (trastornos del metabolismo mineral, anemia, hiperproducción de citoquinas, etc.), y a la baja tasa de aclaramiento de solutos, con su consiguiente elevación en suero/plasma. Tal es el caso del acumulo de citoquinas (p. ej. los riñones parecen ser el sitio primario del catabolismo del TNF- α y cualquier daño en la función renal podría contribuir a su elevación¹⁶⁵), AGEs, estrés oxidativo y una sobrecarga de líquido, convirtiéndose en un estímulo multifactorial para la activación inflamatoria. De hecho, los signos de inflamación sistémica ocurren en paralelo al deterioro de la función renal; adicionalmente, la inflamación parece ser un predictor de la pérdida acelerada de la función renal (entre otras citoquinas proinflamatorias la IL-6, es considerada pro-aterogénica, además de ser un factor patofisiológico que contribuye a la progresión del daño renal)¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

Además la microinflamación suele agravarse de forma paralela con el inicio de las terapias dialíticas. Existe evidencia suficiente de que entre estas terapias particularmente la HD, suelen exacerbar éste fenómeno^{163,169}. El tratamiento sustitutivo renal introduce factores de riesgo pro-inflamatorios en diferente medida pero que al ser persistentes, contribuyen con riesgos adicionales: alteración del perfil lipídico, hiperinsulinemia, formación de AGEs,

infecciones crónicas, factores relacionados al líquido de diálisis (particularmente reabsorción de glucosa), uso prolongado de catéteres para acceso vascular, buffer de acetato del líquido de diálisis, fragmentos bacterianos presentes en el dializado, endotoxinas originadas durante la diálisis y membranas bioincompatibles. El tipo de membrana utilizada en la HD, juega un papel crítico al activar al complemento en diferente magnitud. Las membranas de celulosa bioincompatible (cuprofán) estimulan la liberación de citoquinas proinflamatorias mediante una activación prolongada de Mos, lo cual se asocia con un riesgo relativo de mortalidad de 20% mayor que los pacientes tratados con membranas más biocompatibles como la polimetilmetacrilato, (por su baja capacidad para activar el complemento, etc.^{28,168-179}). Además, se ha demostrado que incluso después de un TR exitoso, el fenómeno inflamatorio prevalece^{29,180}, lo cual es atribuido al propio injerto o al rechazo de este.

Los niveles de PCR se correlacionan con el grado de ATE carotídea en pacientes con IRCT prediálisis²³ en HD¹⁸¹ o en DP¹⁸² también se han relacionado con la ATE de la aorta torácica en pacientes en diálisis y trasplantados renales¹⁸³, así como con hipertrofia ventricular izquierda¹⁸⁴ mientras que su regresión se asocia inversamente con los niveles de PCR¹⁸⁵. Las concentraciones plasmáticas incrementadas de los marcadores de inflamación, además de ser mediadores de la ATE, también son potentes predictores positivos de riesgo CV. Los niveles de PCR predicen la mortalidad total y CV¹⁸⁶, así como el desarrollo de enfermedad coronaria¹⁸⁷ y eventos CV¹⁸⁸. Por lo tanto, los marcadores de inflamación tienen una potencial aplicación clínica, que cobra mayor relevancia si se considera que la ECV es muy frecuente en los sujetos con IRCT y constituye la principal causa de muerte en ellos^{8-13,184,189}. *Mekki K y colaboradores*¹⁹⁰ en una publicación reciente encontraron que tanto la HD como la DP agravan el estrés oxidativo generado por la uremia. La HD por su parte acentúa la peroxidación lipídica y proteica, mientras que la DP agrava la peroxidación lipídica. Por tanto, la actividad de las enzimas antioxidantes se encontró alterada en ambas terapias dialíticas.

Malnutrición e IRCT. Es conocido que el fenómeno inflamatorio sistémico se asocia también con otros factores frecuentemente presentes en la población con IRCT en diálisis, como son la malnutrición, la sobrehidratación y la alta permeabilidad peritoneal^{184,189,191,192}. La malnutrición se puede definir conceptualmente como “*la alteración en la ingestión y/o absorción, metabolismo, excreción y requerimientos metabólicos de nutrientes*”, y tiene una prevalencia estimada en la IRCT entre el 50-70%. Aunque no existe un “estándar de oro”, la monitorización del estado nutricional requiere la utilización conjunta de múltiples parámetros⁵ (Tabla 2). El riesgo de hospitalización y mortalidad se correlaciona inversamente con la malnutrición, y/o con uno de sus marcadores más ampliamente utilizados, la hipoalbuminemia¹⁹³⁻¹⁹⁵. Algunos estudios recientes han demostrado una asociación existente entre la malnutrición/bajos niveles de albúmina con la inflamación y ATE en estos pacientes, predisponiendo a un mal pronóstico, incluso se ha propuesto una entidad denominada “síndrome MIA” (*malnutrition-inflammation-atherosclerosis*, por sus siglas en inglés)^{184,189,195}. Hay múltiples factores que contribuyen al desarrollo de malnutrición en la IRCT. Las alteraciones metabólicas y hormonales, así como la acumulación de toxinas urémicas por la pérdida de la función renal, predisponen a anorexia urémica y a disminución de la ingestión alimentaria¹⁹⁶ (Tabla 3). Resultados preliminares de la *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) III, demostraron que la concentración de PCR aumenta según el FG disminuye¹⁹⁷. Las evidencias sugieren un estado microinflamatorio en pacientes con IRCT, en especial en estadios 3-5. Los efectos metabólicos y nutricionales de la inflamación crónica son muchos e incluyen síntomas como anorexia urémica, caquexia, proteólisis de músculo esquelético, aumento del catabolismo proteico corporal y modulación de la acción de las citoquinas en el hipermetabolismo¹⁹⁵. Las concentraciones elevadas circulantes de TNF- α pueden reducir directamente el inotropismo cardíaco con importantes consecuencias principalmente en pacientes con HD, así como lo hace en pacientes con falla cardíaca crónica¹⁹⁸. Por otro lado las concentraciones bajas de albúmina y aminoácidos, típicamente presentes en los pacientes con IRCT, podría influir en la generación de

lipoproteínas asociadas a la ATE, lo cual condicionaría el desarrollo de enfermedad vascular¹⁹⁹.

Tabla 2. Parámetros para la monitorización del estado de nutrición

Clínica:
<ul style="list-style-type: none"> • Historia Clínica (anamnesis) • Exámen físico nutricional • Escala global subjetiva
Parámetros de laboratorio
<ul style="list-style-type: none"> • Reservas proteicas viscerales: proteínas plasmáticas (albúmina, prealbúmina, transferrina, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1)) • Reservas proteicas estáticas: Creatinina sérica • Otros parámetros: hemoglobina (Hb), urea, creatinina, colesterol y perfil lipidico, bicarbonato • Estado hídrico, electrolítico, ácido base • Linfocitos totales
Peso corporal
<ul style="list-style-type: none"> • Índice de masa corporal (IMC)
Composición corporal
<ul style="list-style-type: none"> • Metodos directos: absorbancia de rayos X de energía dual (DEXA) • Metodos indirectos: hidrodensitometría, bioimpedancia eléctrica (BIVA) • Atropometría: pliegues cutáneos, circunferencia muscular del brazo

Tabla 3. Causas de la malnutrición en IRCT

Las causas potenciales de malnutrición son:
<ul style="list-style-type: none"> • Ingesta insuficiente de energía y nutrientes • Toxicidad urémica • Microinflamación (Síndrome “MIA”) • Acidosis metabólica • Comorbilidades asociadas: DM, lupus eritematoso, IC, etc. • Enfermedades agudas recurrentes • Ingresos hospitalarios • Trastornos endocrino-metabólicos: insulinoresistencia, hiperparatiroidismo secundario, hiperlipidemia, resistencia a la hormona de crecimiento, IGF1.

CD16+ e IRCT. Varios estudios reportan una fuerte asociación entre el daño endotelial y la inflamación crónica en pacientes con IRCT²⁰⁰. El porcentaje de Mos en sangre periférica con fenotipo CD16+ es más alto, tanto en pacientes prediálisis como en diálisis²⁰⁰, sugiriendo que estas células juegan un papel importante en la enfermedad inflamatoria crónica asociada a la uremia y a la terapia de sustitución renal, y que favorecen la perpetuación de este fenómeno²⁰²⁻²⁰⁴. Además, el alto porcentaje de CD16+ en estos pacientes se ha correlacionado con altas concentraciones plasmáticas de micropartículas endoteliales (EMPs) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) sérico, una característica temprana de daño endotelial²⁰⁵.

*Merino A y colaboradores*²⁰⁶ señalaron que los pacientes con IRCT en estadios 4-5 prediálisis tienen un incrementado porcentaje de Mos CD16+ en sangre periférica, incluso en aquellos pacientes sin evidencia clínica de enfermedad inflamatoria. Los CD16+ exhiben telómeros cortados sugiriendo que estas células han prolongado su vida útil. Además, están cargados de citoquinas proinflamatorias maduras en el citoplasma, listas para ser secretadas, que tras su liberación, inducen daño endotelial mostrando una incrementada actividad de ERO y apoptosis (lo cual puede contribuir a un incrementado riesgo de ATE²⁰⁷). De hecho, los CD16+ son independientemente asociados con eventos CV en pacientes con IRCT prediálisis²⁰⁸.

En un estudio de 52 pacientes en HD²⁰⁹ se encontró que el porcentaje y el número absoluto de Mos CD16+ fueron significativamente superiores a la subpoblación de Mos CD16-. *Nockher WA y colaboradores*²¹⁰ además, confirmaron en un seguimiento de pacientes en HD, que este incremento de Mos CD16+ no se asoció con signos de infección, y también notaron una depleción preferencial de CD16+ en las primeras horas de la diálisis con recuperación dentro de las siguientes 4 horas. De hecho, se especula que la liberación de citoquinas por estos Mos pudiera contribuir al síndrome inflamatorio post-HD. Una variedad de factores presentes en estos pacientes pueden estar involucrados en la

activación monocítica, incluyendo, por un lado la presencia de LPS o el uso de dializadores bioincompatibles²¹¹. Las alteraciones en la inmunocompetencia de pacientes con HD crónica han sido intensivamente investigadas. Estos cambios en la inmunidad celular resultan particularmente del estado urémico, así como de la terapia de reemplazo renal. Algunos estudios de la capacidad funcional de las células inmunes han revelado una asociación paradójica entre la activación celular y una respuesta aberrante reducida a estímulos específicos.

El procedimiento de HD se asocia con una activación leucocítica durante el circuito sanguíneo extracorpóreo. El contacto de los componentes de la sangre con el dializador de membrana desencadena un incremento de los niveles plasmáticos del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y un cambio en la subpoblación de MØ de sangre periférica adoptando las características de MØ tisulares (CD16+) e induciendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias con la acción combinada de la activación del complemento, la adherencia leucocitaria y los componentes estimulatorios del dializado (tales como endotoxinas)^{209,211}. Los fragmentos de DNA están presentes en el dializado aún cuando la contaminación bacteriológica haya sido excluida. El DNA bacteriano contiene secuencias de oligodesoxinucleótidos inmunoestimulatorios (ISS-ODN) de 15-20 pares de bases con dinucleótidos de citoquina-guanina no metilados (CpG). Los dinucleótidos CpG, pueden cruzar las membranas de diálisis por retrofiltración²¹¹. Los fragmentos CpG, así como la síntesis de oligodesoxinucleótidos (CpG-ODNs), se unen al TLR-9 de células inmunocompetentes dirigidas a la cascada de señalización de las MAPKs²¹²⁻²¹⁴. Merino A y colaboradores²⁰⁶ investigaron si un estímulo leve tal como la contaminación por el DNA bacteriano (CpGODNs) puede inducir una respuesta inflamatoria por CD16+ en los pacientes en HD y si el valor de las consecuencias biológicas de estas respuestas inflamatorias causan daño endotelial. Sus resultados sugieren los CD16+ tuvieron una expresión incrementada de citoquinas y de TLR-9. Los CpG-ODNs causaron la producción y liberación de citoquinas en los CD16+ pero no en los CD14++. Esta respuesta inflamatoria

fue mediada por señalización intracelular dependiente de NF-KB, p38 MAPK o c-Junc PI3K (quinasa de inositol trifosfato), pero no por activación de MEK1 ó MAP quinasa 1. Estos resultados sugieren que la respuesta inflamatoria inducida por estimulación de los Mos por CpG DNA resulta en una apoptosis celular endotelial.

La migración de los Mos en la pared de los vasos sanguíneos contribuye tanto al inicio como a la progresión de la ATE. *Heine GH y colaboradores*²¹⁵ determinaron en una cohorte prospectiva de 94 pacientes en diálisis, seguidos durante 35 meses, que los CD16+ se asocia con altas tasas de eventos CV y con muerte en población de alto riesgo de pacientes en diálisis.

Por otro lado, la ACE ejerce efectos proinflamatorios y prooxidativos mediante la producción de Ang II²¹⁶. La ACE puede ser detectada en plasma, la mayor parte de ACE existe sobre el revestimiento endotelial de la vasculatura corporal, en las células del parénquima no endotelial, o sobre los leucocitos circulantes (principalmente sobre los Mos)²¹⁶. Los Mos han sido identificados como componentes principales de la placa aterosclerótica y a IRCT induce a un estado de preactivación de los Mos²¹⁷. La expresión de la ACE en los Mos está incrementada en pacientes en diálisis comparada con individuos sanos. Además, la expresión de ACE monocítica se asocia significativamente con la prevalencia de ECV después de ajustarlo a los factores de riesgo clásicos²¹⁸. En este mismo estudio, la ACE monocítica fue más alta en los Mos CD16+ que en los CD16⁻.

Recientemente, ha sido reportado que existe una notable acumulación de CD143, tanto en lesiones ateroscleróticas tempranas como avanzadas, y que esta expresión de novo de CD143 es causada por MØs activados, y puede contribuir a la a la subsecuente progresión de la placa aterosclerosa²¹⁹. En un estudio prospectivo observacional, se describió un nuevo biomarcador combinado en 74 pacientes con IRCT estadio 5 en diálisis. Ambas las altas concentraciones de CD16+ como las de ACE tuvieron un alto valor predictivo de mortalidad

(70% a 2 años) en pacientes con IRCT, donde los eventos asociados a ATE predominaron entre las causas de muerte²²⁰.

La ECV aterosclerótica también es la principal causa de muerte de los receptores de TR. *Ulrich C y colaboradores*²²¹ demostraron que los receptores de TR tienen menores frecuencias de Mos CD16+ que los pacientes en HD y que aquellos pacientes con TR que son tratados con metilprednisolona (p. ej. durante un rechazo agudo).

V. ESTRATEGIAS PARA REDUCIR LA MICROINFLAMACIÓN EN LA IRCT

Aunque la evidencia epidemiológica relaciona estrechamente la inflamación con un peor pronóstico (elevada tasa de morbi-mortalidad), no existen estudios controlados que demuestren la eficacia de las estrategias antiinflamatorias para reducir el riesgo CV o la mortalidad²²² (Tabla 4).

Tabla 4. Factores y marcadores de riesgo CV: objetivos y tratamiento

FACTOR	OBJETIVO	INTERVENCIÓN
Homocisteína	Reducción de sus niveles	Acido Fólico 1-2 mg/d y B ₆ y B ₁₂
PCR microinflamación	Buscar y corregir las causas: infecciones evidentes u ocultas (acceso vascular, catéter, dentales, Chlamydia, H. pylorii) Intolerancia injerto no funcionante Malnutrición Hipervolemia Membranas de diálisis Dializado Peritonitis-infección catéter en DP ¿Fármacos?	Revisiones dentales periódicas Revisión AAVV actual y previos Esperar estudios de intervención con antibióticos macrólidos Embolización o trasplantectomía ¿Suplementos nutricionales? Corregir volemia: diuréticos, UF Membranas biocompatibles Utilizar agua ultrapura Buscar activamente y tratar ¿IECA, ARA II, estatinas, AAS?
Fibrinógeno	Reducir la actividad procoagulante	Cesar tabaquismo en fumadores, dieta y ejercicio en sobrepeso

Por ello, la microinflamación sistémica es un blanco terapéutico, no sólo de la IRCT, si no de las patologías con un trasfondo inmunológico que cursan con dicho fenómeno. No obstante, el camino es escabroso al ser de causa multifactorial particularmente en los pacientes renales, y más aún en los que reciben terapia de sustitución renal⁵.

En este sentido, por un lado se ha tratado de hacer más biocompatibles las soluciones y el material involucrado en la diálisis, pero aún no ha sido utilizado de manera amplia (por diferentes razones) o se encuentra en fase de investigación. Cueto-Manzano AM y

*colaboradores*²²³ demostraron que con el uso de DP nocturna intermitente en comparación a la DP continua ambulatoria se lograba disminuir el TNF- α , la IL-6 y la PCR, lo cual pudo atribuirse a la reducción del tiempo de contacto del peritoneo con la solución de diálisis tras un periodo diurno con “peritoneo seco”, posiblemente ejerciendo un menor estímulo de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, esta medida no puede ser aplicable a todos los pacientes y sólo lo es para algunos de ellos durante un periodo de tiempo limitado. Por su parte, la HD con agua ultrapura o con membranas más biocompatibles reduce los niveles de PCR, aunque no hay evidencias claras de que ello se asocie con una reducción de eventos CV en pacientes en HD. Los pacientes dializados con membranas celulósicas presentan una mayor mortalidad CV e infecciosa que aquellos tratados con membranas sintéticas²²⁴.

Por otro lado, la mayor parte de los tratamientos actuales para las enfermedades autoinmunes e inflamatorias incluye el uso de fármacos inmunorreguladores o inmunodepresores inespecíficos, tales como los glucocorticoides y la talidomida^{225,226}, que aunque son capaces de reducir de manera efectiva la inflamación, no han sido del todo aceptados como una verdadera opción terapéutica por sus efectos adversos.

También se ha indagado sobre tratamientos anti-inflamatorios con un mecanismo de interrupción más específica de las respuestas inmunitarias patológicas, dejando intactas las respuestas inmunitarias normales. Algunas de las formas de interrumpir las respuestas patológicas que actualmente están en investigación (y por el momento aún muy costosas) son²²⁷:

- Utilización de citoquinas anti-inflamatorias o inhibidores específicos de citoquinas como anti-inflamatorios [anticuerpos monoclonales anti TNF- α , proteína de fusión TNF-receptor-Ig recombinante, antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra recombinante), anticuerpos monoclonales anti IL-6, intrerferón- β , interferón- γ , IL-11 e IL-12]. [p.ej. *Hung AM y colaboradores* demostraron en un ensayo controlado con placebo en 14 pacientes en HD que la administración de un antagonista del receptor

de la IL-1 humana recombinante (IL-1ra) redujo un 53% las concentraciones séricas de PCR vs 1% del grupo placebo; un 40% de IL-6 vs 20% del grupo placebo e incrementó un 23% las concentraciones de prealbúmina vs 6% del grupo placebo, no obstante, fue un ensayo piloto de corta duración (4 semanas), que no demuestra los efectos adversos de la droga utilizada, los costes y la repercusión a largo plazo sobre la supervivencia de estos sujetos²²⁸. Don BR y colaboradores²²⁹ después de seguir 433 pacientes, randomizaron 10 pacientes con marcadores elevados de inflamación, 5 recibieron placebo y 5 etanercept (agonista del receptor-2 del TNF- α), el grupo estudio mostró una mejoría relativa del estado inflamatorio, no obstante, tuvieron un aumento del riesgo de infecciones. Con fines similares, en el año 2000 nuestro grupo inició un ensayo que incluyó 382 pacientes que fueron seguidos durante 2 años. Al final de este periodo solo se incluyeron 5 pacientes con inflamación persistente a los que se les administró infliximab (anticuerpos anti-TNF- α) durante 18 semanas, quienes tuvieron mejoría del estado nutricional y de la calidad de vida (*datos en vía de publicación*). Ambos trabajos tuvieron una muestra con escaso número de pacientes con inflamación persistente]. Uso de agentes terapéuticos como anticuerpos monoclonales anti-linfocitos T o B.

- Inducción de anergia mediante la administración de Ag 4 asociado a linfocito T citotóxico soluble.
- Empleo de Ig intravenosa para ciertas infecciones y enfermedades mediadas por inmunocomplejos.
- Utilización de citoquinas específicas para reconstituir los componentes del sistema inmunitario (IL-12 e IL-7).

Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II) han demostrado efectos anti-inflamatorios y reducen la producción de citoquinas en pacientes con IRCT²³⁰. Las estatinas reducen los niveles de

PCR en pacientes en diálisis, independientemente de sus efectos sobre los lípidos^{231,232}. Aunque algunos informes sustentan que el uso de IECA, ARAII o de estatinas se asocia con niveles menores de marcadores de inflamación en pacientes con IRCT²³⁰⁻²³². Por el contrario, *Ordaz-Medina SM y colaboradores*²³³ recientemente demostraron en un ensayo clínico controlado con placebo, doble ciego y al azar, que enalapril no disminuyó las concentraciones séricas de IL-6 ni de PCR en pacientes con HD. En la población general la reducción del riesgo de IAM con el uso de aspirina se relaciona con la reducción de los niveles de PCR^{234,235}; sin embargo, en pacientes renales no se ha observado una reducción de los niveles de PCR con este mismo medicamento²³⁶.

VI. PENTOXIFILINA (PTX)

La PTX[‡], un inhibidor no específico de la fosfodiesterasa (iPDE) y derivado de la dimetilxantina, podría ser una alternativa eficaz desde por su efecto anti-inflamatorio vascular sistémico en los sujetos con IRCT.

Este fármaco ha sido extensamente estudiado en modelos animales y en humanos (pacientes sin falla renal) y se han reconocido sus propiedades como un potente agente antitrombótico/antiplaquetario y hemorreológico. La PTX parece tener un efecto profiláctico para la predisposición trombogénica²³⁷. Al parecer no actúa como vasodilatador y las dosis terapéuticas no ocasionan modificaciones notables en la frecuencia cardíaca, el gasto cardíaco o en la resistencia vascular periférica²³⁸. Se piensa que las respuestas clínicas a largo plazo de la PTX prescrita por vía oral son en parte resultado de la mayor flexibilidad de los eritrocitos debido a el iPDE y al aumento resultante del AMPc en los glóbulos rojos, así como por la disminución de la viscosidad de la sangre; a esta última puede contribuir una menor concentración de fibrinógeno e inhibición de la agregación plaquetaria, de glóbulos rojos y de granulocitos²³⁸⁻²⁴⁰. La PTX, además de su efecto sobre el depósito y la degradación de colágeno, puede ejercer un efecto antifibrogenético reduciendo la proliferación células productoras de la matriz extracelular inducida por el PDGF. Este efecto parece ser mediado por una reducción de actividad quinasa regulada por señal extracelular (ERK), a su vez estimulada por PDGF, así como de otras vías de señalización intracelular tales como la elevación del calcio citosólico inducido por PDGF²⁴¹. La PTX está involucrada en la polarización y quimiotaxis de linfoblastos T y células T de sangre periférica, un efecto similar fue observado sobre la migración transendotelial de estas células. Además, la polarización de neutrófilos, su adherencia al endotelio y su migración transendotelial también suele ser inhibida por PTX²⁴².

[‡] VER APENDICE I: FICHA TECNICA ESPAÑOLA

VI.a PTX Y SU EFECTO ANTI-INFLAMATORIO. Recientemente, se le ha considerado a la PTX como un potencial candidato para el tratamiento de la microinflamación vascular sistémica.

Por un lado se podría especular que el efecto anti-NF- κ B de la PTX vía iPDE es iniciado por la activación de la cascada AMPc-proteínquinasa A (PKA), la cual a su vez suprime la vía MAPK raf-1/p42/44²⁴³ y la resultante activación del NF- κ B²⁴⁴. Por otro lado, la actividad anti- NF- κ B de PTX no sólo es mediada por el iPDE²⁴⁵. *Biswas y colaboradores*²⁴⁶ demostraron que la PTX inhibe la activación de NF- κ B vía protéínquinasa C (PKC), pero no por mecanismo dependiente de PKA. La PTX reduce la fosfo-PKC inducida por TNF y los niveles de *fosfo-c-jun*, sugiriendo que la PTX puede modular también la actividad NF- κ B en una manera similar a la callostina C (inhibidor selectivo de PKC)²⁴⁷.

Por otro lado, *Doherty y colaboradores*²⁴⁸ investigaron los efectos de la PTX sobre la producción de TNF estimulada por endotoxinas *in vitro* e *in vivo*, y demostraron que la PTX no tiene ningún efecto sobre la estabilidad del RNAm de TNF, pero sí parece actuar inhibiendo la producción celular de TNF (RNAm) en respuesta a la endotoxina. Asimismo, la PTX puede inhibir la hipersensibilidad de contacto murino, proceso en el cual el TNF- α está críticamente involucrado²⁴⁹. Secuencialmente, un estudio piloto reveló que la PTX también puede reducir las reacciones de la dermatitis de contacto en humanos²⁵⁰. *Neuner y colaboradores*²⁵¹ demostraron que la PTX puede inhibir la liberación de IL-1 β , IL-6 e IL-8 en células mononucleares de sangre periférica tanto *in vivo* como *in vitro*. El tercer componente del complemento (C3) es sintetizado y secretado por las células endoteliales humanas como parte de su respuesta inflamatoria²⁵². Citoquinas tales como TNF- α e IL-1 incrementan la síntesis de C3 por las células endoteliales^{253,254}. *Hoie EB y colaboradores*²⁵⁵ demostraron que las HUVEC tratadas con TNF- α incrementan la expresión del RNAm de C3 y la liberación de la proteína C3. PTX inhibió tanto la expresión del RNAm de C3 como la liberación de la proteína, mecanismo que no es conocido. También se ha demostrado que la

PTX inhibe la expresión de fractalquina después del tratamiento de CML con TNF- α , efecto resultante de la inhibición del NF- κ B. Permanece abierta la pregunta acerca del efecto de la PTX sobre la producción de C3 mediada por TNF- α como resultado o no de la inhibición del NF- κ B. La actividad anti-NF- κ B de PTX puede ser mediada, al menos en parte, por la retención citoplasmática de complejos I- κ B α -p65²⁴⁷.

El bloqueo selectivo de citoquinas inflamatorias ha tenido un éxito limitado en estudios de sepsis y shock séptico. La poliquimioterapia dirigida a mediadores inflamatorios específicos ha sido necesaria en el tratamiento de condiciones tales como el shock séptico, síndrome de distrés respiratorio del adulto, IAM y accidente cerebrovascular (ACV). El beneficio de la PTX en varias enfermedades es aún ambiguo. Sin embargo, se ha reportado que la PTX tiene valor en muchas patologías inflamatorias y vasculares, incluyendo la disfunción orgánica múltiple, falla renal aguda, claudicación, ACV y cardiomiopatía isquémica (CI)²⁵⁶.

*Sliwa K y colaboradores*²⁵⁷ demostraron que en pacientes con fallo cardíaco debido a disfunción isquémica ventricular izquierda, la adición de PTX a la terapia estándar mejoraba el estado clínico y la fracción de eyección, acompañados por reducciones significativas de marcadores de inflamación (TNF- α y PCR). También, por su efecto inmonomodulador (anti-TNF- α), la PTX mostró efectos benéficos *versus* placebo sobre la clase funcional *New York Heart Association* (NYHA), fracción de eyección y mortalidad en pacientes con falla cardíaca^{257,258} (Tabla 5).

VI.b La PTX en la IRCT: En el ámbito de la enfermedad renal, existen algunas evidencias que sugieren su efecto benéfico. *Gallardo JM y colaboradores*²⁵⁹ en un estudio realizado en ratas con IRC (por nefrectomía 5/6), demostraron que la PTX previene el incremento en las concentraciones séricas de TNF- α y estrés oxidativo inducido por alta ingesta de sodio en la dieta.

Tabla 5. Algunos ensayos clínicos^{270,272-274} de PTX en falla cardiaca

ESTUDIO	PACIENTES	<i>n</i>	INTERVENCIONES	RESULTADOS
<i>Sliwa et al (1998)</i>	Con cardiomiopatía dilatada y falla cardiaca congestiva, NYHA clase II o III, con fracción de eyección (FE) ≤ 40% entre 18-70 años	28	PTX 400mg al día x 6 meses Ensayo clínico controlado con placebo aleatorizado	Mejoría de la clase funcional NYHA y de la FE
<i>Skudicky et al (2000)</i>	Con cardiomiopatía dilatada en NYHA clase II o III y FE ≤ 40%	49	PTX 400mg al día x 6 meses Ensayo clínico controlado con placebo aleatorizado	Mejoría en concentraciones plasmáticas de TNF-α y diámetro ventricular izquierdo
<i>Skudicky et al (2000)</i>	Con cardiomiopatía dilatada en NYHA clase II o III y FE ≤ 40%	39	PTX 400mg al día x 6 meses Ensayo clínico controlado con placebo aleatorizado	Mejoría de la clase funcional NYHA, FE, tamaño del ventrículo izquierdo y tolerancia al ejercicio
<i>Sliwa et al (1998)</i>	Con cardiomiopatía dilatada crónica, NYHA clase IV, con fracción de eyección (FE) 40%, diámetro ventricular >55mm	18	Todos recibieron dobutamina intravenosa PTX 400mg al día x 1 mes y terapia convencional Ensayo clínico controlado con placebo y terapia convencional	Mejoría clase funcional NYHA, dimensiones del ventrículo izquierdo, citoquinas en plasma y niveles APO-1

En un estudio realizado en sujetos diabéticos con falla renal avanzada (<35 ml/min) aún sin diálisis, la PTX disminuyó notablemente la proteinuria y el TNF-α sérico²⁶⁰. En otro estudio no controlado ni aleatorizado, realizado en 16 sujetos (11 en HD y 4 en DP), la PTX incrementó las cifras de hemoglobina en sujetos que habían tenido anemia resistente al empleo de eritropoyetina (EPO) lo cual se atribuyó a la reducción de los niveles de interferón gamma y TNF-α²⁶¹.

Recientemente, se publicó un estudio que sirvió como Maestría en Farmacología de la estudiante que pretende conseguir actualmente el grado de Doctorado. Este fue un ensayo clínico doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo, comparando el efecto de

la PTX sobre los marcadores séricos de inflamación sistémica en pacientes en HD²⁶². Se demostró que la PTX reduce significativa y progresivamente a lo largo de 4 meses, las concentraciones séricas de TNF- α , IL-6 y PCR. Estos resultados sugerirían que la PTX puede ser un tratamiento efectivo contra el fenómeno inflamatorio comúnmente presente en estos sujetos. Sin embargo, aún quedan muchas preguntas pendientes, tales como ¿Cuáles serían los mecanismos y marcadores celulares anti-inflamatorios posiblemente implicados? ¿Podría estar la PTX implicada en la DE? Si lo anterior es así ¿Qué mecanismos podrían explicar el papel de la PTX en la modulación de la DE? Estos y otros cuestionamientos se pretenden contestar en el presente estudio.

JUSTIFICACIÓN

Para ser un buen científico hay que saber decir “no sé” a tiempo.

Lee Smolin (1955). Físico teórico y cosmólogo estadounidense.

JUSTIFICACIÓN

La IRCT constituye hoy en día un problema sanitario, social y económico de especial relevancia, con gran impacto mundial¹⁻². En la actualidad, 36,388 personas la padecen en España, lo que equivale a decir que hay 1009 pacientes con enfermedad renal ppmh⁵. Se estima que 17,000 pacientes tienen HD, 2,500 DP y otros tantos han sido trasplantados por una patología renal. La edad mediana de estos pacientes es de 65 años, incrementándose la frecuencia de la enfermedad a partir de los 70 años. Las principales causas de la IRC son la DM y la enfermedad hipertensiva⁵. Si estos datos son alarmantes, lo son todavía más si se considera la enfermedad renal “oculta” que no se diagnostica corrientemente y que puede representar una proporción mucho mayor. Muchos individuos aparentemente sanos son portadores de algún grado de enfermedad renal sin ellos conocerlo. Se calcula que por cada paciente que empieza HD, hay 100 con algún grado de enfermedad renal. En cuanto a la incidencia, se practican aproximadamente 4,000 HD y 555 DP cada año. De esta manera, España presenta una incidencia media dentro de la Unión Europea, entre los 213 por millón de Alemania y los 69 por millón de Islandia. Además del problema médico personal de cada paciente, que no tiene valor calculable, y los problemas sociales y familiares, el coste que representa al Estado es algo digno de tenerse en cuenta. Tan sólo el coste directo de la HD en España es superior a los mil quinientos millones de euros al año⁵. En México se realizan investigaciones acerca de esta enfermedad y sus implicaciones, pero generalmente se aborda el tema desde el punto de vista clínico y no desde la perspectiva económica. Hablando de los costos, la DP cuesta alrededor de 136,605 pesos por paciente al año, en tanto que la HD 198,000 pesos, esto podría explicar en parte que el 70% de los insuficientes renales recibe DP y un 30% HD^{1,2}. Estimaciones de organismos internacionales como el USRDS, han determinado, con base a datos obtenidos en el estado de Jalisco, que la incidencia de la IRCT para México en el año 2006 fue 346 personas por millón. Además, se

estima que cada año se suman alrededor de 35 mil pacientes más en todo el sistema, lo que representa un grave problema, tanto en el presente como en el futuro cercano, para las finanzas del sector público de la salud¹.

A pesar de todos los avances realizados y todo el dinero invertido en el tratamiento de la IRC, la mortalidad de los pacientes con falla renal sigue siendo muy alta (comparable a la de pacientes con cáncer¹); por lo que el reto actual es incrementar su sobrevida. Existe una fuerte evidencia que sustenta la relación entre la función renal disminuida y la ECV, la cual es la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en pacientes con IRC desde estadios tempranos de la enfermedad, así como perpetúa y empeora el pronóstico global del paciente en estadios más avanzados de la IRC, tanto pre-, post-diálisis y post-TR^{14,27-29}. La falla renal es considerada un factor de riesgo CV independiente¹³. Los pacientes con insuficiencia renal tienen múltiples factores de riesgo CV, tanto tradicionales (HTA, dislipidemia, tabaquismo, DM tipo 2, etc.)¹⁷⁻¹⁹ como propios de la uremia (anemia, alteraciones del metabolismo calcio-fosforo, hipervolemia, la terapia de sustitución renal en sí), a los que se les añaden factores no tradicionales [Lp(a), hiperhomocisteinemia, estado prooxidante, protrombótico y proinflamatorio]²⁰.

La inflamación es la respuesta a una variedad de estímulos que causan daño tisular o enfermedad, dando lugar a un incremento en las concentraciones séricas de marcadores (más pro-inflamatorios que anti-inflamatorios), con repercusión sistémica a diferentes órganos. Este fenómeno se denomina “*Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica*” o “*microinflamación*” y tiene dos tipos de efectos dañinos: los masivos (p. ej. sepsis) y los de bajo grado (p. ej. los presentes en la IRCT, Lupus Eritematoso, VIH, etc). Estos marcadores van desde muy sensibles y poco específicos (p. ej. NF- κ B, TNF- α , IL-1, IL-6, PCR, IL-10, CAM, iNOS, etc.) a menos sensibles y más específicos (p. ej. Mos CD16+), y son ampliamente reconocidos como predictores de riesgo CV, y por lo tanto, con potencial aplicación clínica⁶⁶⁻⁶⁷. En los últimos años ha llamado fuertemente la atención la estrecha

asociación observada entre la inflamación sistémica de bajo grado o microinflamación (como factor de riesgo CV emergente) y la ATE^{23,24,26,34}, sobre todo por tener un papel trascendental, la primera, en la génesis, progresión, y resultados clínicos de la segunda³²⁻³⁵. Por otro lado, en el caso de la IRCT (tanto pre- y post-diálisis, y post-TR), existen numerosas evidencias que la relacionan con la microinflamación (con una prevalencia entre 30-50%), considerándola una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado *per se*, y constituyendo a su vez un factor de riesgo CV independiente^{23,161-164}. En su frecuente asociación con la malnutrición / bajos niveles de albúmina sérica y ATE, se ha propuesto la entidad denominada “síndrome MIA” (*malnutrition-inflammation-atherosclerosis*, por sus siglas en *inglés*), lo que predispone a un peor pronóstico^{183,188,194}.

Por lo anterior expuesto, la microinflamación en la IRCT provee las bases clínicas para considerar terapias en la prevención de la ECV. Sin embargo, no existen suficientes estudios que demuestren la eficacia de estrategias anti-inflamatorias para reducir el riesgo CV o la mortalidad en estos pacientes, por lo que no existe un tratamiento único reconocido^{222,227}. Pero al considerarla como blanco terapéutico la dificultad estriba en la multifactoriedad de este fenómeno, sobre todo en la IRCT²²⁷. La mayor parte de tratamientos actualmente disponibles incluye fármacos inmunorreguladores o inmunodepresores inespecíficos (glucocorticoides, talidomida^{225,226}) o más específicos (anticuerpos monoclonales anti-TNF- α , etc.) que reducen la inflamación efectivamente pero no son aceptados por su alto coste, sus efectos adversos o están aún en etapa de investigación²²⁷.

Aunque no se ha definido con precisión el mecanismo anti-inflamatorio de la PTX, hay evidencia de que posee actividad anti-NF- κ B (mediada por iPDE, vía PKC)²⁴⁷, anti-citocinas proinflamatorias (anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-IL-6 etc)^{249,251} y anti-C3²⁵⁵, sin contemplar sus propiedades ampliamente reconocidas como antitrombótico, antiplaquetario y hemorreológico²³⁷ y su capacidad para inhibir la polarización de leucocitos, su adherencia al endotelio y migración transendotelial²⁴². Lo anterior hace que la PTX pueda ser

considerada un potencial candidato para el tratamiento de la microinflamación. En el ámbito de la enfermedad renal existen algunas evidencias que sugieren su efecto benéfico. *Gallardo JM y col*²⁵⁹, en un estudio realizado en ratas con IRC (por nefrectomía 5/6), demostraron que la PTX previene el incremento en las concentraciones séricas de TNF- α y estrés oxidativo inducido por alta ingesta de sodio en la dieta. En un estudio realizado en sujetos diabéticos con falla renal avanzada (<35 ml/min) aún sin diálisis, la PTX disminuyó notablemente la proteinuria y el TNF- α serico²⁶⁰. En otro estudio no controlado ni aleatorizado, realizado en 16 sujetos (11 en HD y 4 en DP), la PTX incrementó las cifras de hemoglobina en sujetos que habían tenido anemia resistente al empleo de EPO, lo cual se atribuyó a la reducción de los niveles de interferón gamma y TNF- α ²⁶¹. Recientemente, nuestro grupo demostró en un ensayo clínico, doble ciego, aleatorizado y controlado que la PTX (400 mg/día vía oral durante 4 meses de seguimiento) redujo progresiva y significativamente las concentraciones séricas de TNF- α , IL-6 y PCR en pacientes (sujetos mexicanos) con HD (n = 18, PTX) sin infección o drogas con efecto anti-inflamatorio vs pacientes control (n = 18, placebo). La principal conclusión de este estudio es que la PTX podría ser una estrategia prometedora y útil para reducir la inflamación sistémica observada con frecuencia en pacientes en HD²⁶². Este hallazgo dio las bases para continuar indagando sobre esta droga, ya que por un lado está disponible dentro del cuadro básico de los sistemas de salud de México y España, es de bajo coste, con mínimos efectos adversos, y se postula como una medida terapéutica eficaz, eficiente y de cierta manera preventiva de futuros eventos CV.

El presente estudio pretende investigar el efecto de la PTX sobre la microinflamación vascular sistémica en una población de sujetos españoles con IRCT tanto en DP como en HD. En este sentido, aporta conocimientos novedosos como la evaluación de su efecto sobre la subpoblación de Mos proinflamatorios CD16+ en sangre periférica por su relevante papel en la ATE²¹⁴, así como sobre marcadores de DE y sobre la respuesta de la función endotelial antes y después de someter a los pacientes de estudio a una prueba de isquemia

vascular. Además se evaluó el efecto de la PTX sobre distintos marcadores de inflamación tanto en endotelio como en CML vascular (*in vitro*), lo que posiblemente resulte potencialmente útil en el manejo de la ECV en sujetos con IRCT en diálisis de nuestro medio, y seguramente a nivel internacional.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

PARTE CLÍNICA.

Objetivo General.

Evaluar el efecto de la PTX sobre la modulación de la microinflamación sistémica y DE en pacientes con insuficiencia renal en diálisis.

Objetivos Particulares:

1. Identificar la presencia de microinflamación a través de marcadores proinflamatorios (TNF- α , IL-6, PCR) y anti-inflamatorios (IL-10 y Fetuina A) en sangre periférica de pacientes con insuficiencia renal en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.
2. Identificar las variaciones porcentuales y cuantitativas de la subpoblación de Mos proinflamatorios CD16+ en sangre periférica de pacientes con insuficiencia renal en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.
3. Identificar en Mos CD16+ la capacidad secretora de marcadores proinflamatorios (TNF- α , IL-6) y anti-inflamatorios (IL-10) de pacientes con insuficiencia renal en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.
4. Evaluar el efecto de la PTX sobre marcadores de DE [PAI-1, TM, Hcy, Lp(a), VCAM-1, MCP-1, VEGF, TGF- β 1 y PDGF] en sangre periférica de pacientes con insuficiencia renal en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.
5. Evaluar las concentraciones plasmáticas de t-PA y NO₃ resultantes de una prueba de VO para medir DE realizada en pacientes con insuficiencia renal en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

PARTE *IN VITRO*.

Objetivo General.

Evaluar *in vitro* los posibles mecanismos implicados en las respuestas a PTX sobre la microinflamación y DE.

Objetivos Particulares:

1. Evaluar la expresión de la proteína MyD88 en células HUVEC tratadas o no con el sobrenadante de Mos CD16+ de pacientes con insuficiencia renal en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.
2. Evaluar el efecto de diferentes dosis de PTX sobre los niveles de NO₂ y la expresión de iNOS en HASMC estimuladas con IL-1 β .
3. Evaluar el efecto de PTX sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en HUVEC estimuladas con IL-1 β y TNF- α .

MATERIALES Y MÉTODOS

“Los grandes espíritus siempre han encontrado una violenta oposición de parte de mentes mediocres.”

Albert Einstein (1879-1955). Científico alemán.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente protocolo se evaluó el efecto de la PTX sobre el estado microinflamatorio sistémico, factor de riesgo emergente y pronóstico de la elevada morbilidad y mortalidad CV de los pacientes con IRCT en diálisis y objeto principal de nuestro estudio. Se llevo a cabo en dos partes: una parte clínica realizada en pacientes con IRCT en diálisis vs controles sanos, cuyo diseño corresponde a un ensayo cuasiexperimental (antes-después, controlado), y una parte básica que se basó llevó a cabo en modelos *in vitro*.

INVESTIGACION CLÍNICA

La presente investigación clínica tuvo sus bases en los hallazgos sobre el efecto antiinflamatorio (disminución significativa de las concentraciones séricas de citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 y PCR) de la PTX vs placebo en un ensayo clínico realizado en sujetos mexicanos con IRCT en HD²⁶¹. Por un lado, el presente estudio reevalúa la propiedad anti-inflamatoria de PTX sobre citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 y PCR) y su efecto sobre células específicas con actividad proinflamatoria en sangre periférica (subpoblación de Mos CD16+), y por otro lado, evalúa su efecto sobre citoquinas antiinflamatorias (IL-10 y Fetuina A), así como sobre proteínas (detectables en plasma) implicadas en la DE en una población de sujetos españoles con IRCT, tanto en DP como en HD antes y después de tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

El proyecto se realizó en pacientes con IRCT en DP y HD, y en controles sanos procedentes del Hospital Universitario de la Princesa (HULP). La investigación clínica se

desarrolló en el Servicio de Nefrología (SN) y en la Unidad de Biología Molecular (UBM) del mismo hospital, mientras que la investigación básica se realizó tanto en la UBM, del HULP, como en el Departamento de Farmacología y Terapéutica, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, España.

La coordinación del proyecto ha sido supervisada por:

- Director de Tesis en España: Dr. Abelardo Aguilera Peralta, Investigador Médico del Servicio de Nefrología, HULP, Madrid, España.
- Tutores de Tesis en España: Dra. Concepción Peiró Investigadora Biomédica de la UAM, Madrid, España y Dr. Jose Antonio Sánchez Tomero Jefe del Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de La Princesa.
- Director de Tesis en México: Dr. Alfonso M. Cueto Manzano, jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Renales (UIMER), Hospital de Especialidades, CMNO, IMSS, Guadalajara, Jalisco México.
- Co-Directora de Tesis en México: Dra. Ana Rosa Rincón Sánchez, Coordinador(a) del Programa Educativo de Posgrado de la Maestría/Doctorado en Farmacología.

Una muestra total de 47 sujetos fueron incluidos, quienes cumplieron con los siguientes criterios (*Esquema 1*):

1. Criterios de Inclusión

1.1 Pacientes en DP

- Ambos sexos.
- Entre 18 y 70 años de edad.
- Pacientes estables en DPCA y DPA con una permanencia superior a 2 meses.
- Con dosis adecuada de diálisis.
- Pacientes con indicación de tratamiento con PTX de acuerdo a las indicaciones de la Ficha Técnica Española[¥] y con prescripción realizada por su Nefrólogo no relacionadas con el presente estudio.
- Con su consentimiento informado[#] firmado por escrito en el que autorizaron al personal médico y de laboratorio utilizar sus muestras de sangre periférica con fines de investigación (presente estudio)

1.2 Pacientes en HD

- Ambos sexos.
- Entre 18 y 70 años de edad.
- Pacientes estables en HD con permanencia superior a 2 meses.
- Con dosis adecuada de diálisis.
- Con catéter percutáneo o fístula arteriovenosa interna (FAVI).
- Pacientes con indicación de tratamiento con PTX de acuerdo a las indicaciones de la Ficha Técnica Española[¥] y con prescripción realizada por su Nefrólogo no relacionadas con el presente estudio.

[¥] VER APENDICE I: FICHA TECNICA ESPAÑOLA

[#] VER APENDICE III: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES CON IRCT EN DIALISIS

- Con consentimiento informado[#] firmado por escrito en el que autorizaron al personal médico y de laboratorio utilizar sus muestras de sangre periférica con fines de investigación (presente estudio).

1.3 Controles Sanos

- Ambos Sexos.
- Entre 18-70 años de edad.
- A quienes se les realizó una analítica de rutina y donaron muestra de sangre periférica.
- Con consentimiento informado[§] firmado por escrito en el que autorizaron al personal médico y de laboratorio utilizar sus muestras de sangre periférica con fines de investigación (presente estudio).

2. Criterios de no inclusión

2.1 Pacientes en diálisis

- Los pacientes con enfermedad grave o inflamatoria (*ejemplo: vasculitis, lupus eritematoso sistémico u otra colagenopatía, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad hepática de cualquier tipo entre otras*), infecciosa (*ejemplo: peritonitis – al menos 2 meses antes de participar en el estudio-, VIH entre otras*), y cáncer (excepto DM o ECV), como causa, o en su defecto, asociada a la IRCT, ya que pudiera interferir con los resultados finales del estudio.
- Aquellos que recibieron fármacos anti-inflamatorias o inmunosupresoras (ej., antibióticos, corticosteroides, AINEs, estatinas, tocoferoles, vitamina C y E,

[¥] VER APENDICE I: FICHA TECNICA ESPAÑOLA

[#] VER APENDICE III: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES CON IRCT EN DIALISIS

[§] VER APENDICE II: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA SUJETOS SANOS

entre otras), por su influencia sobre vías inflamatorias al menos 2 meses antes de su participación en el estudio.

- Con trasplante previo de cualquier tipo.

2.2 Controles Sanos

- Sujetos que hayan tenido alguna infección de cualquier tipo en los 2 meses anteriores.
- Aquellos que recibieron fármacos anti-inflamatorias o inmunosupresoras (ej., antibióticos, corticosteroides, AINEs, estatinas, tocoferoles, vitamina C y E, entre otras), por su influencia sobre vías inflamatorias al menos 2 meses antes de su participación en el estudio.

3. Criterios de eliminación

3.1 Pacientes con diálisis

- Cuando después de haber sido incluidos los pacientes en el estudio se estableció el diagnóstico de las enfermedades arriba señaladas o recibieron fármacos antiinflamatorios o inmunosupresores que interfiera con los eventos finales del estudio.
- Aquellos pacientes a los que se les realizó TR no previsto (donador cadavérico) se eliminaron del estudio, pero no del análisis.
- Cuando por alguna razón se suspendió la administración del medicamento (por ejemplo efectos secundarios indeseables) se eliminaron del estudio, pero no del análisis.

3.2 Controles sanos

- Cuando después de haber sido incluidos los pacientes en el estudio se estableció el diagnóstico de las enfermedades arriba señaladas o recibieran

fármacos antiinflamatorios o inmunosupresores que interfiera con los eventos finales del estudio.

Procedimientos en los sujetos del estudio:

El tamaño de muestra del presente ensayo fue realizado a conveniencia²⁶³. La selección de sujetos que se incluyeron en el presente estudio fue como sigue:

- Un total de 30 pacientes con IRCT estables fueron incluidos, con la siguiente distribución:
 - 15 en DP.
 - 15 en HD.

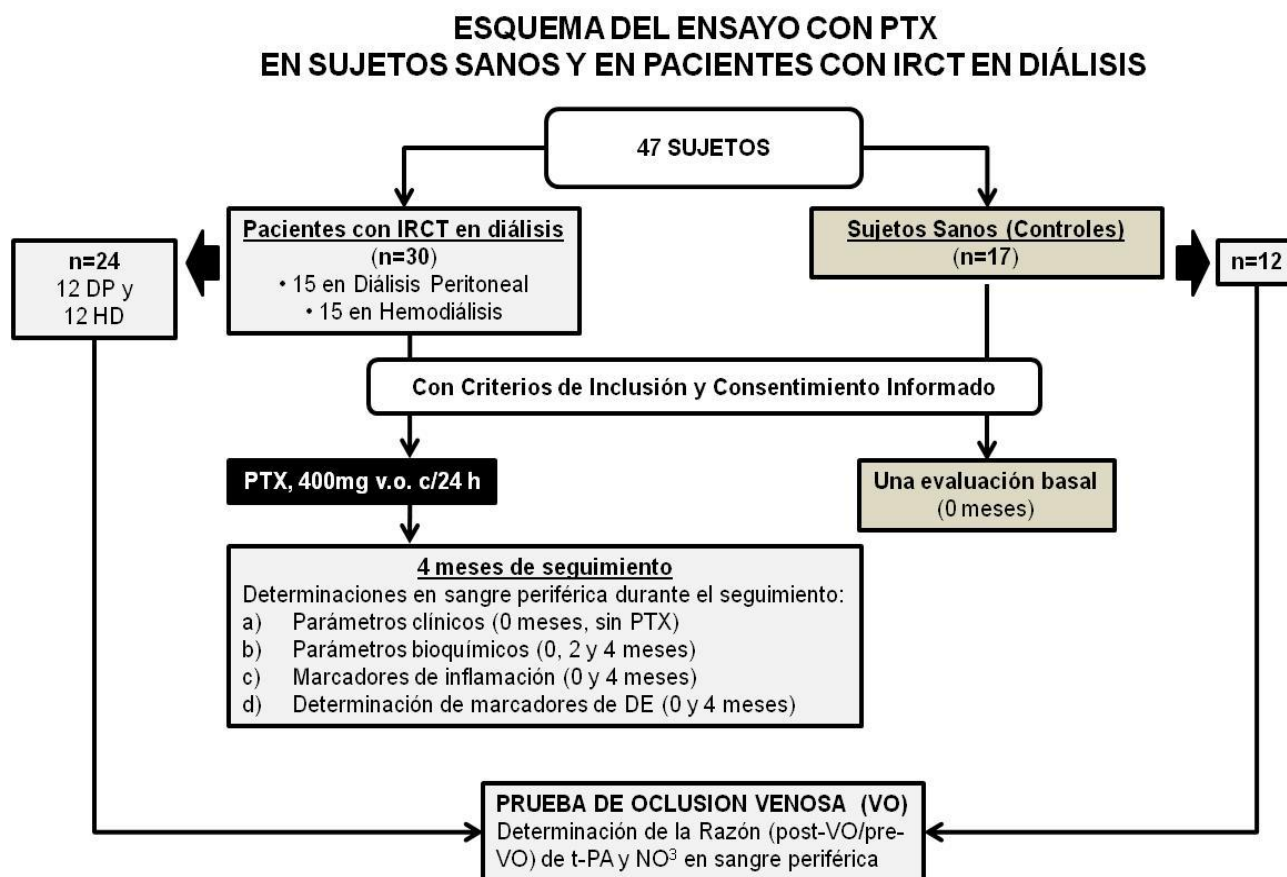
En un periodo de seguimiento de 4 meses, el grupo de estudio de 30 pacientes en diálisis recibió una tableta de PTX (400 mg) vía oral una vez al día (durante la noche). En estos sujetos se recolectaron datos clínicos basales y los datos bioquímicos²⁴ a los 0 (muestras séricas basales sin tratamiento con PTX), 2 y 4 meses (muestras séricas de seguimiento en tratamiento con PTX), correspondientes a los exámenes de rutina habitualmente practicados por el Servicio de Nefrología. Junto a la extracción sanguínea de rutina (10 ml), se extrajeron 30 ml más de sangre periférica *a posteriori* de haber firmado el consentimiento informado escrito. La condición para la extracción sanguínea fue que el paciente se encontrara en ayuno de 8 horas y la muestra fue extraída previa al procedimiento dialítico; a partir de la muestra donada se realizaron los procedimientos de investigación experimental descritos abajo.

- 17 sujetos voluntarios sanos (controles) fueron estudiados sólo de forma basal, al igual que el grupo de pacientes previamente descrito. El momento de la obtención de

²⁴ VER APENDICE V: HOJAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICOS y BIOQUÍMICOS

la muestra de sangre periférica coincidió con una analítica que tuvieron programada como control de rutina para evaluar su estado general de salud.

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 1200 rpm por 10 min, se extrajo el suero, se alicuotó y almacenó a -80°C para analizarlo posteriormente evitando periodos de recongelación.



Esquema 1. Esquema de investigación clínica

Determinación de marcadores de inflamación:

La determinación cuantitativa de las concentraciones séricas de citocinas humanas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6, PCR) y anti-inflamatorias (IL-10 y Fetuina A), se realizó mediante el método de ELISA (acrónimo del Inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) en pacientes en diálisis, así como en el

sobrenadante de Mos CD16+ (post-cultivo de 24h) antes y después del tratamiento con PTX (0 y 4 meses) vs controles sanos sin tratamiento (0 meses):

Las concentraciones de **TNF- α** (rango de sensibilidad de 0.038-0.191 pg/mL), **IL-6** (rango de sensibilidad de 0.016-0.110 pg/ml), **IL-10** (sensibilidad: con dosis mínima detectable en humanos, típicamente menor de 0.5 pg/mL) y **Fetuna A** (sensibilidad de 0.35 ng/ml) se cuantificaron por kits de inmunoensayo de alta sensibilidad siguiendo el protocolo indicado por el manual del fabricante según su kit respectivo (*Quankitine® HS, Human TNF- α , IL-6 and IL-10, Immunoassay R&D Systems y Quantikine Human Fetuin-A, Immunoassay BioVendor Research and Diagnostic Products, respectivamente*). Los valores de absorbancia fueron medidos a 492 nm utilizando un micro lector de ELISA (MD 5000, Dynatech Laboratories). Las concentraciones séricas de **PCR**, fueron determinadas por nefelometría (*Dade Behring, Germany*) en un Analizador de Nefelometría II (*Dade Behring, Germany*); las determinaciones de PCR fueron mediciones de rutina.

Separación de Mos CD16+:

Para la separación de la subpoblación de Mos CD16+ de polimorfonucleares (PBMcs), la fracción leucocitaria fue aislada a partir de sangre periférica anticoagulada (con heparina o EDTA) tanto de voluntarios sanos como de pacientes con IRCT mediante diálisis por gradiente de separación (*Ficoll densidad 1.077 g/ml; BioWhittaker Lymphocyte Separation Medium; Lonza, Germany*). A partir de los PBMcs, mediante un kit de aislamiento de Mos basado en un sistema *Multi Stand* con columnas de tipo “LD” magnetizadas se separó la población total de Mos por selección negativa (*Non-monocyte depletion cocktail and MiniMACS separation columns, type LD; Miltenyi Biotec, Bergish-Gladbach, Germany*). Posteriormente, se procedió a través de un kit de aislamiento de CD16+, con columnas de tipo “MS” magnetizadas, a separar la subpoblación de Mos proinflamatorios CD16+ por selección positiva (*CD16+ microbeads and MiniMACS Separation columns, type MS; Miltenyi Biotec Bergish-Gladbach, Germany*). El número total

de Mos, tanto de la población total como de la subpoblación CD16+ sin y con PTX, fueron determinados por contador celular (*Nihon Kohden*).

Cultivo de Mos CD16+:

Los Mos CD16+ aislados fueron lavados con PBS sin calcio/magnesio y resuspendidos en medio de cultivo M199 [*BioWhittaker*; suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS, fetal calf serum), 10% de L-Glutamina, 2% HEPES y 1% Penicilina/Estreptomicina] en placas de 24 pocillos, durante 24 horas. El sobrenadante de los CD16+ fue almacenado a -80°C para analizarlo posteriormente, considerando tras las determinaciones periodos de recongelación para evitar alteraciones en las concentraciones de las citoquinas que fueron determinadas.

Determinación de marcadores de DE:

El método de ELISA y de electroforesis capilar se utilizaron para determinar las concentraciones plasmáticas de marcadores de DE, de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX (0 y 4 meses) vs controles sanos sin tratamiento (0 meses):

- **PAI-1** (*ELISA Kit PAI-1 American Diagnostica® Inc. EE.UU.*)²⁶⁴.
- **TM** (*ELISA Kit Asserachrom TM: Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France*)²⁶⁵.
- **Lp(a)** (*ELISA Kit BioSCREEN™ Lp(a)*, basado en el empleo de un AcM anti-apo(a) como anticuerpo de captura y un AcM-anti apo B conjugado a la peroxidasa como anticuerpo detector)²⁶⁶.
- **Hcy** (*Homocysteine ELISA kit, Bio-Rad Lab, Oslo, Norway*)²⁶⁷.
- **VCAM-1** (*VCAM ELISA kit, Diaclone, disponible a partir de IDS, Tyne and Wear, UK*)²⁶⁸.
- **MCP-1** (*MCP-1 ELISA kit, Bender MedSystems, Burlingame, CA, USA*)²⁶⁹.

- **VEGF** (*Human VEGF Quantikine ELISA Kit R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU*)²⁷⁰.
- **TGF- β** (*TGF- β Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU*)²⁷¹.
- **PDGF** (*Human PDGF-BB Quantikine ELISA kit, Minneapolis, MN, EE.UU*)²⁷².

Las determinaciones de ELISA fueron efectuadas de acuerdo al protocolo de manufactura. Las concentraciones de los anteriores parámetros fueron determinados de acuerdo a la curva estándar y respectivas diluciones. Los valores de absorbancia fueron medidos a 492 nm utilizando un micro lector de ELISA (MD 5000, *Dynatech Laboratories*).

Prueba de Oclusión Venosa:

Se realizó la prueba de oclusión venosa (VO) en 24 pacientes de los grupos de tratamiento (12 en DP y 12 en HD) y en 12 controles sanos (n = 24, selección al azar). La prueba se basa en la observación de que tras un periodo de oclusión venosa se produce isquemia en un brazo y evaluación de la respuesta endotelial a través de un marcador de la capacidad fibrinolítica (t-PA), y de un marcador de la capacidad vasodilatadora (NO₃). El principio y método de esta prueba consiste en colocar un manguito de baumanómetro alrededor del brazo no dominante y se infla a mitad de camino entre la presión sistólica y diastólica (pero <100 mm Hg) por un periodo de 10-20 minutos. Antes de ocluir la circulación venosa y después de la VO al finalizar la prueba distal al manguito, pero con este aún inflado se tomaron muestras de sangre periférica (10 ml) que fueron recogidas en tubos de *vacutainer*, (*Becton-Dickinson*), conteniendo 0.129 mol/L de citrato sodio de anticoagulante, en reposo y ayuno previo. Las muestras fueron centrifugadas a 1200 rpm por 10 min, se extrajo el plasma, se alicuotó y almacenó a -80°C para analizarlo posteriormente evitando periodos de recongelación.

El método de ELISA se utilizó para determinar las concentraciones plasmáticas de t-PA y NO₃⁻, de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX (0 y

4 meses) vs controles sanos sin tratamiento (0 meses): **t-PA** (*ELISA Kit Coaliza t-PA: Chromogenix, Mö Indal, Sweden*)²⁷³.

El NO_3^- (producto de NO) se cuantificó por la técnica de electroforesis capilar en tubos de sílica, en condiciones de alto voltaje (arriba de 30kV) y de campo eléctrico. Para este propósito, el buffer utilizado fue el sistema Tris 0,02 M pH = 8,6 para generar un flujo endo-osmótico. Se realizó la cuantificación por detección indirecta de absorbancia ultravioleta a 214nm.

INVESTIGACION *IN VITRO*

Los resultados observados a partir de la investigación clínica del efecto antiinflamatorio y modulador de proteínas implicadas en la DE de la PTX en sangre periférica de sujetos con IRCT en diálisis vs controles sanos sin tratamiento; dieron lugar a la siguiente directriz de investigación llevada a cabo en modelos *in vitro*, en donde se evaluó de nuevo el efecto antiinflamatorio de la PTX pero en endotelio (HUVEC) y en músculo liso (HASMC) vascular.

CULTIVOS CELULARES

Materiales:

El suero bovino fetal (FCS), la tripsina y los medios de cultivo fueron proporcionados por *Biological Industries, Beit Haemek, Israel* y *BioWhittaker Cell Culture Instructions, Lonza, Germany* y el material plástico para el cultivo de las células de *TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland*. La collagenasa P se obtuvo de *Hoffman-La Roche Ltd., España*. La IL-1 β recombinante humana y el TNF- α fueron suministrados por *PeptoTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA*, el inhibidor de NF- κ B, TAK-1 inhibitor por (5Z)-7-oxozeaenol from *AnalytiCon Discovery GmbH, Germany* y la PTX (3,7-Dimetil-1-(5-oxohexyl)xantina; *Trental C₁₃H₁₈N₄O₃ FW 278.31*) por *Sigma-Aldrich Co., USA*.

Obtención y cultivo de células de músculo liso de aorta humana (HASMC):

Las HASMC fueron obtenidas por disociación enzimática mediante collagenasa P (*Hoffman-La Roche Ltd., España*), de fragmentos de aorta humana provenientes de donadores del Hospital Universitario de Getafe, de acuerdo a las disposiciones legales de España. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo modificado por Dulbecco (*DMEM, Biological Industries, Beit Haemek, Israel*), suplementado con 10% de FCS (*Biological Industries, Beit Haemek, Israel*). Para su almacenamiento, las HASMC fueron crecidas hasta

su confluencia, se tripsinizaron, contaron y resuspendieron en medio de congelación [DMEM al 10% de FCS y 7.5% de DMSO (*Dimethyl sulfoxide*, Merk KGaA, Darmstadt, Germany)] a -80°C hasta el momento de realizar el ensayo correspondiente. Las células fueron usadas en los pases 3 a 10. Para los experimentos, las HASMC fueron privadas de suero durante 24 horas, procediendo a la adición de los diferentes componentes de prueba según el protocolo en medio libre de suero.

Determinación de Nitritos (NO_2^-):

Las HASMC fueron expuestas a diferentes componentes de prueba. Una vez establecidos los cultivos celulares (HASMC) confluentes, se utilizó medio con un porcentaje de FCS reducido (DMEM 0,1%) durante 24 horas. Se realizaron ensayos por duplicado inicialmente se preincubó (30 minutos) con PTX (1 y 10 mg/ml) y después con diferentes concentraciones con IL-1 β (2,5, 5 y 10 ng/ml), durante 18 horas. Los niveles de nitritos se midieron en los sobrenadantes celulares usando el método de *Griess*. Los sobrenadantes fueron recogidos y colocados en una placa de 96 pocillos, se les añadió reactivo *Griess* [ácido fosfórico 5%, sulfonamida 1%, agua destilada, *N*-(1-naftil)etil-enediamina]] y se construyó una curva patrón con concentraciones conocidas de NO_2^- por duplicado. Se incubó durante 10 minutos sin luz y a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm dentro de la primera hora. Los valores derivados fueron normalizados al contenido de proteína total determinada por el método de *Bradford*.

Obtención y cultivo de células endoteliales a partir de venas de cordón umbilical humano (HUVEC):

Las células endoteliales se aislaron partir de venas de cordones umbilicales humanos (HUVEC), utilizando en cada extracción tres cordones umbilicales con un

protocolo aprobado por el comité ético del Hospital Universitario de Getafe (*Peiró y col. 2007*). Los cordones se recogieron en recipientes estériles con medio de cultivo *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM; *Biological Industries, Biet Haemek, Israel*), suplementado con 0,1% de seroalbúmina bovina (BSA), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina, 2,5 µg/ml de anfotericina B y 0,05% de heparina. Antes de la extracción de las células endoteliales, las venas umbilicales se canularon en uno de sus extremos, y tras lavar con PBS sin calcio/magnesio, uno de los extremos del cordón se cerró con una pinza de clampar y por el otro extremo se introdujeron 2 ml de colagenasa-P al 0.05% (*Hoffman-La Roche Ltd, España*). Tras clampar el otro extremo del cordón, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, permitiendo así la acción de la enzima. Pasado el periodo de incubación se cortó uno de los extremos del cordón y se recogió en una placa de Petri estéril la solución de colagenasa-P, arrastrando células endoteliales y hematíes. Para obtener el mayor número de células posibles, se lavó el interior de la vena con PBS sin calcio/magnesio, recogiendo todo el eluyente. Este se añadió a un tubo estéril que contenía DMEM con 10% de FCS y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. El precipitado resultante, se resuspendió y se centrifugó en las mismas condiciones, repitiéndose este proceso otras dos veces hasta obtener el precipitado lo más limpio posible de glóbulos rojos. El precipitado final se resuspendió en M199, suplementado con 20% de FCS, 25 µg/ml de suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS), 100 µg/ml de heparina y los antibióticos anteriormente mencionados, y se sembró en una placa de cultivo de 60 mm de diámetro cubierta previamente con colágeno tipo I, disuelto en ácido acético 0,1 M al 0,03%. Este primer cultivo de células endoteliales se incubó en una estufa a 37°C con una atmósfera del 5% de CO₂, reemplazando el medio de cultivo cada dos días hasta alcanzar la confluencia. Para los experimentos posteriores se utilizaron las células entre los pases 1 y 5, que se realizaron mediante la utilización de tripsina al 0,05%.

Protocolo experimental para citometría de flujo en cultivo de células HUVEC:

Una vez establecidos los cultivos celulares confluentes, se realizaron ensayos con IL-1 β y TNF- α (5 ng/ml) y PTX (1 mg/ml) durante 18 horas.

Citometría de Flujo:

Tanto la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 como VCAM-1 se analizaron mediante la técnica de citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos. Para ello se sembraron las HUVEC en placas de 6 pocillos y tras el tratamiento mencionado anteriormente, se recogieron utilizando una solución de tripsina disuelta en PBS al 0.05% y se fijaron con paraformaldehído al 2% (15 min, a temperatura ambiente). Se bloquearon (30 min) con solución PBS con 3% de albúmina de suero bovino (BSA), con el propósito de evitar la unión de los anticuerpos a sitios inespecíficos. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario monoclonal frente a ICAM-1 (clon 6.5B5), VCAM-1 (clon IE5) ambos de *Chemicon (Millipore, Temecula, CA, USA)*, diluidos 1:100 en una solución de PBS con 0.05% de BSA durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, y tras lavar con PBS, se añadió el anticuerpo secundario apropiado, unido al fluoróforo *Alexa Fluor 488*: (dilución 1:250; *Molecular Probes-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*) en PBS con 0,05% de BSA durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 500 μ l de PBS y se mantuvieron a 4°C en la oscuridad hasta su análisis en el citómetro de flujo FACSscan (BD *Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA*). Para el análisis, primero se seleccionó la población celular según su tamaño y complejidad. A continuación, se midió la intensidad de fluorescencia excitando el fluoróforo del anticuerpo secundario a 488 nm y recogiendo la luz emitida a 519 nm utilizando el programa informático *Cell Quest* (BD *Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA*).

Western Blotting:

Los niveles de iNOS en HASMC y de MyD88 en HUVEC, se cuantificaron mediante la técnica de *Western Blotting*. Para la cuantificación de iNOS, las HASMC se trataron con concentraciones crecientes de IL-1 β (2,5, 5 y 10 ng/ml) o se pre-incubaron (45 min) en

medio con diferentes concentraciones de PTX (1, 10 y 100 mg/ml) durante 18 horas. Para la cuantificación de MyD88, las HUVEC sin tratar y tratadas con Tak-1 (Inhibidor de NF-KB vía clásica, a una C.F. de 600nM) y con sobrenadante de CD16+ de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX y de controles sanos sin tratar con PTX durante 24 horas. Para la extracción de proteínas, tras cumplirse el tiempo de tratamiento las células se lavaron con PBS y se añadió 150µl de tampón de lisis suplementado con un cocktail inhibidor de proteasa, 10mM de ortovanadato sódico y 0,5 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) (RIPA, *Lysis Buffer System*, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA) y se dejó actuar durante 5 minutos en hielo. Los lisados celulares obtenidos se dejaron en hielo durante 15 min y se centrifugaron durante 1 min a 13,000 rpm a 4°C, desechando el precipitado y recogiendo el sobrenadante para medir las concentraciones de proteínas totales por el método colorimétrico del ácido bicinónico (BCA; *Pierce, Rockford, IL, USA*). Las muestras obtenidas se guardaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Para la cuantificación de estas proteínas, los extractos celulares se separaron por electroforesis en condiciones desnaturizantes sometidos a una corriente constante de 110V, utilizando geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Para ello, y una vez cuantificado los extractos proteicos, se utilizaron 20µg de proteínas diluidas en tampón de Laemli 4x [125 mM de Tris, 2% de dodecilsulfato sódico (SDS), 5% de glicerol, 1% de β-mercaptoetanol y 0,025% de azul de bromofenol] y se hirvieron las muestras durante 5 minutos a 100°C. Una vez separadas las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*Bio-Rad Laboratories, S.A., Madrid, España*) durante 3 horas a 300 mA constantes. Una vez transferidas las proteínas, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de TBS-T [0,4 M de Tris, pH 7,5, 0,3M de NaCl y 0,2% DE Tween-20] y 5% de leche en polvo desnatada para bloquear la unión de anticuerpos posteriormente utilizados a sitios inespecíficos. A continuación se incubó la membrana con un anticuerpo primario frente a iNOS *policlonal anti-rabbit* (dilución 1:250; *Laboratorios Transduction, Lexington, KY, USA*) para HASMC y anticuerpo primario

monoclonal mouse anti-MyD88 (dilución 1:100; de Santa Cruz *Biotechnology, Inc.*, Santa Cruz CA, USA) para HUVEC, durante toda la noche a 4°C, seguido de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano [*goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate* (dilución 1:10,000) de *BioRad Laboratories* e *IgG-HRP goat anti-mouse* (dilución 1:5000) de Santa Cruz *Biotechnology, Inc.*, Santa Cruz CA, USA], respectivamente. La detección de *Alpha Tubulin, mouse monoclonal* [(dilución 1:200) de Santa Cruz *Biotechnology, Inc.*, Santa Cruz CA, USA] y *GAPDH mouse monoclonal* [(*Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*); dilución 1:2500, *Sigma-Aldrich Co.*, USA] fueron usados como controles internos respectivamente. Las bandas fueron detectadas usando un kit de detección de quimioluminiscencia (*SuperSignal West Pico; Pierce Biotechnology, Inc.*, Rockford, IL, USA) y cuantificadas por densitometría usando el *software IMAGE (KODAK ID digital Science)*.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables dimensionales se muestran como media \pm desviaciones estándar (DE) en los análisis clínicos y error estándar de la media (EEM) en los análisis básicos, en el caso de que la distribución de los datos fuera paramétrica, o mediana (percentilas 25-75%) si tuviera distribución no paramétrica. Las variables nominales se muestran como número o porcentajes. Las diferencias intergrupo fueron comparadas mediante *t* de *Student* o *U* de *Mann-Whitney*. Las diferencias intragrupo (antes-después) mediante *Wilcoxon*. Se consideró significativo un valor $p < 0.05$.

El análisis estadístico de las variables clínicas se hizo considerando las tres evaluaciones clínicas y bioquímicas (0, 2 y 4 meses de seguimiento), no obstante con el fin de facilitar la presentación de los datos, los resultados se muestran sólo como determinaciones basales y finales en los grupos de tratamiento (DP y HD). En vista de que la valoración intermedia fue similar a la valoración final en los diferentes parámetros, aquí presentamos solo una de ellas (la final). Puesto que no hubo seguimiento en los controles sanos, cuando se menciona que se compara contra éstos se refiere a comparaciones hechas contra los valores de sus únicas evaluaciones (basales).

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los aspectos éticos de la presente investigación se establecen en los lineamientos y principios generales del Reglamento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y las medidas de seguridad en el tratamiento de la información conforme al R.D. 1720/2007, correspondiente a los aspectos éticos de la investigación en seres humanos en España, lugar donde se realizó el estudio; El protocolo se sometió y fue autorizado por el Comité de Ética e Investigación Clínica del HULP (C.E.I.C. acta 10/09 registro PI-372)*.

* VER APENDICE VI: AUTORIZACION DEL PRESENTE PROTOCOLO POR EL COMITÉ DE ETICA E INVESTIGACION DEL HULP

RESULTADOS

“Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano.”

Isaac Newton (1642-1727). Matemático, físico, y astrónomo inglés.

RESULTADOS

RESULTADOS CLÍNICOS

Resultados demográficos de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.

Se estudiaron 15 sujetos en DP y 15 en HD, así como 17 controles sanos. La **Tabla 6** muestra la comparación entre las variables demográficas al inicio del estudio entre los grupos; aunque en los pacientes en diálisis en comparación al grupo control, la edad tendió a ser mayor y el sexo predominante fue el masculino, no se observó ninguna diferencia significativa. En ambos grupos de diálisis, las principales causas de IRCT fueron enfermedad renal poliquística, glomerulonefritis crónica e hipertensión arterial.

Tabla 6. Variables demográficas al inicio del estudio de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

VARIABLE	SANOS (n = 17)	DIALISIS PERITONEAL (n = 15)	HEMODIALISIS (n = 15)
EDAD (años)	49.4 ± 7.4	50 ± 16.1	64.3 ± 19.7
MASCULINO (%)	8 (47.1)	13 (86.7)	11 (68.8)
CAUSA DE IRCT, n (%)			
Desconocida		1 (6.7)	1 (6.7)
DMNID		2 (13.3)	4 (26.7)
GNC		3 (20)	1 (6.7)
ERPQ		3 (20)	1 (6.7)
HTA		3 (20)	5 (33.3)
Otras		3 (20)	3 (20)

DMNID = Diabetes Mellitus no Insulinodependiente; GNC = Glomerulonefritis Crónica; ERPQ = Enfermedad Renal Poliquística; HTA = Hipertensión.

Resultados clínicos de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.

La **Tabla 7** muestra la comparación de resultados de las variables clínicas de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento. Tanto la tensión arterial sistólica (TAS) como diastólica (TAD) fueron significativamente mayores al inicio y al final del seguimiento en ambos grupos de diálisis que en el grupo control. Al final del seguimiento, se observó una disminución de las cifras de TAS y TAD en ambos grupos de pacientes en diálisis, siendo sólo significativa en DP. Por su parte, el peso fue menor en los controles y en los pacientes con HD; sólo los pacientes en DP tuvieron un peso significativamente mayor al final del estudio en comparación al de los controles sanos.

En cuanto a los pacientes en diálisis, ambos grupos tuvieron una permanencia similar en la terapia de sustitución renal [DP: 60 (48-120) meses; HD 60 (36-72) meses]. En el caso de los sujetos en DP, la técnica predominante fue la automatizada [diálisis peritoneal continua cíclica (DPCC, 80%) y diálisis peritoneal intermitente tidal (DPIT, 7%)] mientras que la DPCA se llevó a cabo en una pequeña proporción (13%). De los pacientes con HD, 14 (93%) tuvieron fístula arteriovenosa interna y sólo 1 (7%) tuvo catéter percutáneo. El 67% usaba un dializador FX80 Helixona y el 33% HF80 Helixona (ambos tipos son considerados como biocompatibles); sólo un paciente recibía 2 sesiones por semana, mientras que el resto lo hacía 3 veces a la semana. En ambos grupos de pacientes con diálisis, la dosis de diálisis (KT/V_{urea}) fue recibida con valores reconocidos universalmente como aceptables durante todo el estudio. Asimismo, la dosis de eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) recibida también fue la recomendada para ambos grupos y no hubo diferencias antes ni después del seguimiento.

Tabla 7. Comparación de las variables clínicas de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

VARIABLE	SANOS (n = 17)	DIALISIS PERITONEAL (n = 15)		HEMODIALISIS (n = 15)	
		Basal	Final	Basal	Final
TA SISTÓLICA (mmHg)	120.2 ± 7.6	142.3 ± 19.3*	134.3 ± 12.4*§	136.5 ± 11.0*	134.2 ± 7.1*
TA DIASTÓLICA (mmHg)	72.8 ± 8.4	83.2 ± 14.5*	79.3 ± 11.0*§	79.2 ± 9.5*	77.8 ± 6.6*
Peso (Kg)	74.2 ± 11.0	78.5 ± 6.4	79.7 ± 6.4*	75.3 ± 8.3	76.5 ± 7.7
rHuEPO (U/kg/semana)		92.5 ± 37.8	90.5 ± 35.9	101.2 ± 45.6	99.0 ± 43.1
KT/V _{UREA} (semanal o sesión)		2.2 ± 0.5	2.3 ± 0.5	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.2

* $p < 0.05$ vs sanos; § $p < 0.05$ vs evaluación basal del mismo grupo; rHuEPO = eritropoyetina recombinante humana.

Resultados bioquímicos de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.

La **Tabla 8** muestra la comparación de resultados de las variables bioquímicas de pacientes con IRCT antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento. Las cifras de hemoglobina, hierro y ácido fólico de los pacientes con IRCT en diálisis fueron menores en todo momento que las de los sujetos sanos, pero no diferentes entre los sujetos con DP y HD; en relación a las dos últimas variables bioquímicas, aunque en los dos grupos de pacientes con daño renal tendieron a mejorar al final del seguimiento, en ninguno alcanzaron los valores de los sujetos controles.

Las cifras de glucosa fueron mayores al inicio y al final del seguimiento en los grupos de diálisis vs los controles, y al final del seguimiento tendieron a disminuir en los pacientes en DP pero aumentaron significativamente en los de HD. Las concentraciones de colesterol, HDL y LDL fueron significativamente menores en los grupos de diálisis en comparación con los controles, mientras que la urea, como era de esperarse, fue significativamente mayor en ambos grupos en diálisis que en los controles sanos. Las cifras de leucocitos y de Vitamina B12 no mostraron diferencias intra-grupo ni inter-grupo.

Tabla 8. Comparación de las variables bioquímicas de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

VARIABLE	SANOS (n = 17)	DIALISIS PERITONEAL (n = 15)		HEMODIALISIS (n = 15)	
		Basal	Final	Basal	Final
Hemoglobina (g/dL)	14.3 ± 1.3	12.0 ± 1.1*	12.1 ± 1.0*	11.2 ± 1.6*	12.2 ± 1.0
Leucocitos (miles/mm ³)	6.6 ± 1.4	7.7 ± 1.2	7.1 ± 1.7	6.8 ± 1.5	6.5 ± 1.8
Hierro (µg/dL)	92.2 ± 34.4	77.4 ± 20.6	83.1 ± 35.0	67.0 ± 32.1*	74.9 ± 28.9
Vitamina B12 (pg/mL)	581.5 ± 221.4	650 ± 339.7	574.1 ± 139.1	631.2 ± 288.1	556.9 ± 207.2
Acido Fólico (ng/mL)	10 (6.3-13.5)	3.8 (3 – 6.5)*	7.2 (5.2-15)§	3.6 (2.9-5.8)*	6.0 (3.2-14.2)§
Glucosa (mg/dL)	91.2 ± 13.1	101.3 ± 17.6	94.1 ± 7.8	116.7 ± 24.7*	128.4 ± 60.5* £
HDL-colesterol (mg/dL)	62.9 ± 15.2	44.9 ± 9.7*	47.3 ± 11.4*	42.3 ± 9.1*	44.3 ± 14.8*
LDL-colesterol (mg/dL)	109.9 ± 26	77.2 ± 28.6*	84.3 ± 21.5	74.8 ± 39.3*	73.8 ± 39.4*
Urea (mg/dL)	30.8 ± 8.4	132.9 ± 36.7*	126.5 ± 40.3*	122.1 ± 41.9*	145 ± 45.1* §

* $p < 0.05$ vs sanos; § $p < 0.05$ vs evaluación basal del mismo grupo; £ $p < 0.05$ vs misma evaluación del grupo de DP.

La **Tabla 9** muestra la comparación de las variables bioquímico-nutricionales de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs sujetos sanos sin tratamiento. Las concentraciones de colesterol total, y transferrina fueron menores significativamente desde el inicio del estudio en ambos grupos de diálisis en comparación con los controles sanos. La albúmina sérica, por su parte, fue menor en los grupos en diálisis que en los controles, pero aumentó en ambos grupos de pacientes con IRCT después del tratamiento con PTX.

Asimismo, los triglicéridos y la creatinina fueron mayores en ambos grupos de pacientes en diálisis comparados con los controles, aunque los triglicéridos tendieron a disminuir en ambos grupos con falla renal después de ser tratados con la droga de estudio. Por otro lado, la calcemia no mostró diferencias entre los grupos durante todo el estudio, mientras que las concentraciones fósforo y el producto calcio x fósforo fueron mayores en los grupos de pacientes en diálisis que en los controles sanos. Después del tratamiento con PTX, los sujetos en DP disminuyeron las concentraciones de fósforo y del producto calcio x

fósforo, mientras que en los sujetos en HD el fósforo se mantuvo estable. El resto de las variables no mostraron diferencias intra-grupo ni intergrupo.

Tabla 9. Comparación de las variables bioquímico-nutricionales de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

VARIABLE	SANOS (n = 17)	DIALISIS PERITONEAL (n = 15)		HEMODIALISIS (n = 15)	
		Basal	Final	Basal	Final
Colesterol (mg/dL)	197.6 ± 30.4	156.3 ± 32.5*	150.6 ± 26.8*	161.9 ± 43.2*	148.6 ± 47.6*
Triglicéridos (mg/dL)	98 (71-239)	123 (100-232)	109 (99-126)	179 (142.5-296.5)* [£]	150.5 (105.5-229.5) [£]
Albumina (g/dL)	4.4 ± 0.5	3.8 ± 0.3*	3.9 ± 0.2* [§]	3.5 ± 0.4*	4.1 ± 0.3* [§]
Prealbumina (mg/dL)	28.6 ± 6.0	30.6 ± 6.0	27.7 ± 6.7	31.7 ± 6.9	30.6 ± 7.5
Creatinina (mg/dL)	0.9 ± 0.2	7.7 ± 2.3*	7.6 ± 2.0*	8.9 ± 2.7*	9.1 ± 2.5*
Transferrina (mg/dL)	309.9 ± 43.4	218.9 ± 28.2*	231 ± 39.7* [§]	192.1 ± 40.0* [£]	189.6 ± 37.8* [£]
Calcio total (mg/dL)	9.5 ± 0.6	9.3 ± 0.6	9.3 ± 0.8	9.7 ± 0.7	9.5 ± 0.6
Fósforo (mg/dL)	3.8 ± 0.4	4.9 ± 0.9*	4.3 ± 0.9* [§]	4.3 ± 1.1	4.3 ± 0.9
Calcio x Fósforo (mg)	36.2 ± 5.4	45.6 ± 9.2*	39.8 ± 7.1 [§]	42.2 ± 12.1*	40.8 ± 12.3

* $p < 0.05$ vs sanos; [§] $p < 0.05$ vs evaluación basal del mismo grupo; [£] $p < 0.05$ vs misma evaluación del grupo de DP. Las cifras de colesterol señaladas hacen referencia al total.

Resultados de marcadores proinflamatorios (TNF- α , IL-6, PCR y CD16+) y antiinflamatorios (IL-10 y Fetuina A) en sangre periférica de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.

Las **Figuras 5-10** muestran la comparación de los marcadores proinflamatorios así como antiinflamatorios en la sangre periférica de los pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento. Aunque se observó una amplia dispersión de los valores, las concentraciones séricas (medianas) de las citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α → IL-6 → PCR) (**Figuras 5-7**), disminuyeron significativamente en ambos grupos de diálisis después del tratamiento con PTX, si bien los niveles siempre fueron mayores que los de los controles sanos, tanto al inicio como al final del seguimiento.

En relación a las determinaciones de los marcadores anti-inflamatorios, las concentraciones séricas basales de IL-10 fueron menores en los grupos de diálisis comparados con los controles sanos, y aunque se incrementaron notablemente después del tratamiento con PTX no alcanzaron los mismos valores que los controles al final del estudio (**Figura 8**); La Fetuina A, por su parte, no fue diferente en los grupos con diálisis en relación a los controles, pero se incrementó significativamente en los primeros grupos después del tratamiento, particularmente en el caso de los sujetos con DP (**Figuras 9**).

Un marcador aún más específico del estado inflamatorio sistémico es la medición de la subpoblación de Mos proinflamatorios o activados CD16+ en sangre periférica (**Tabla 10** y **Figura 10**). En el presente estudio, la cuantificación de CD16+ en los controles sanos fue significativamente menor que la cuantificación basal de los pacientes con DP y HD (sin diferencias entre ellos). Después del tratamiento con PTX hubo una disminución de los CD16+ en ambos grupos de diálisis, aunque la disminución fue más marcada en el grupo con DP que en de HD.

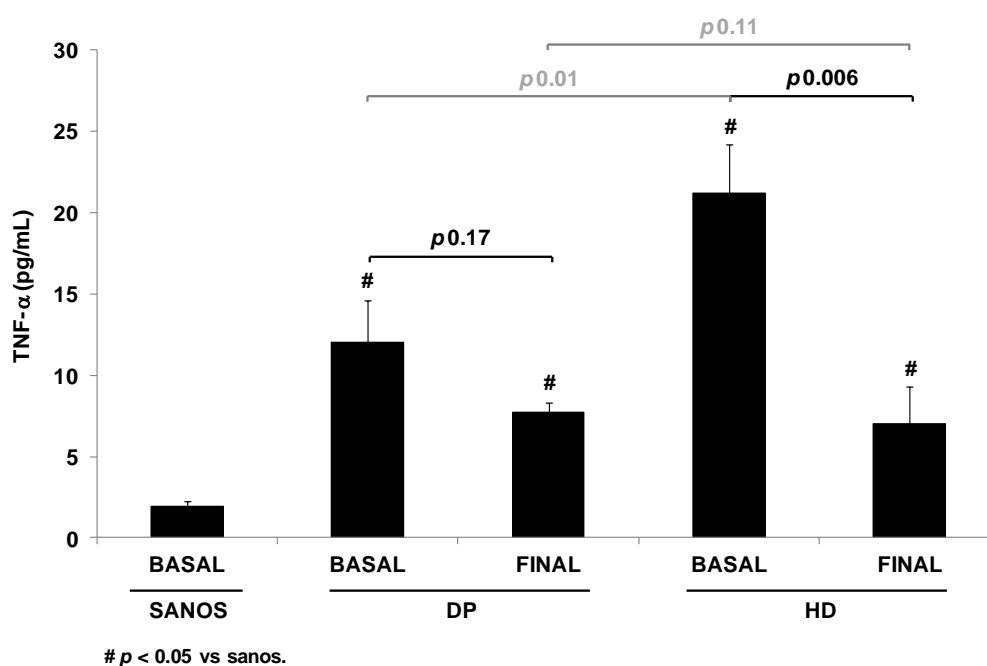


Figura 5. Concentraciones séricas de TNF-α de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

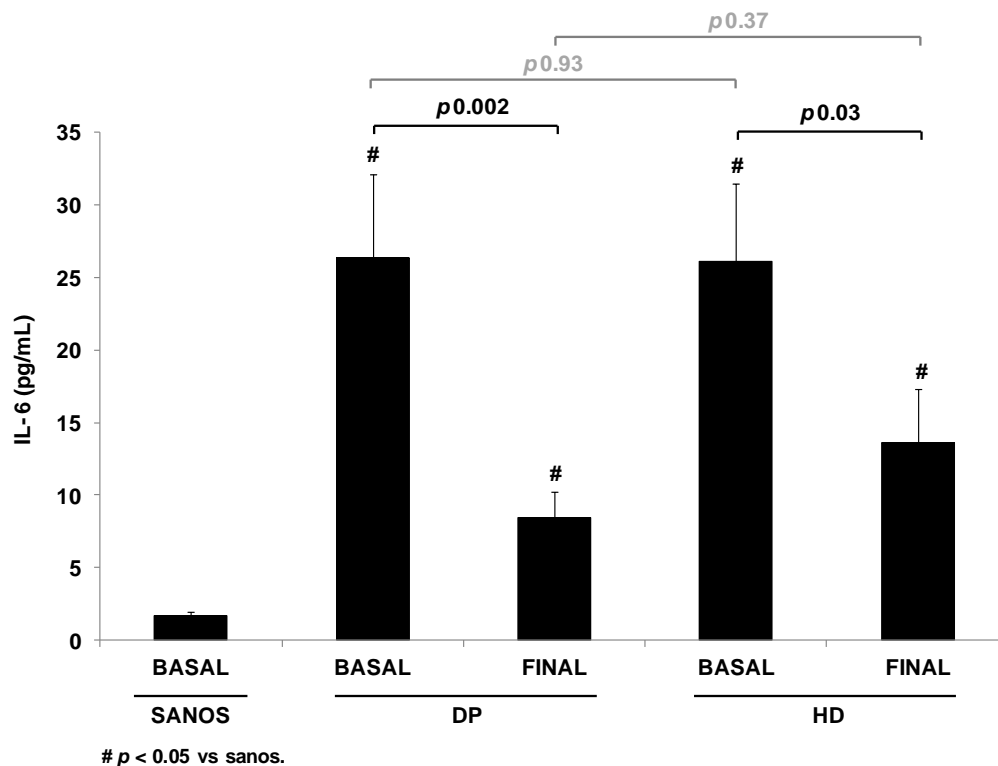


Figura 6. Concentraciones séricas de IL-6 de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

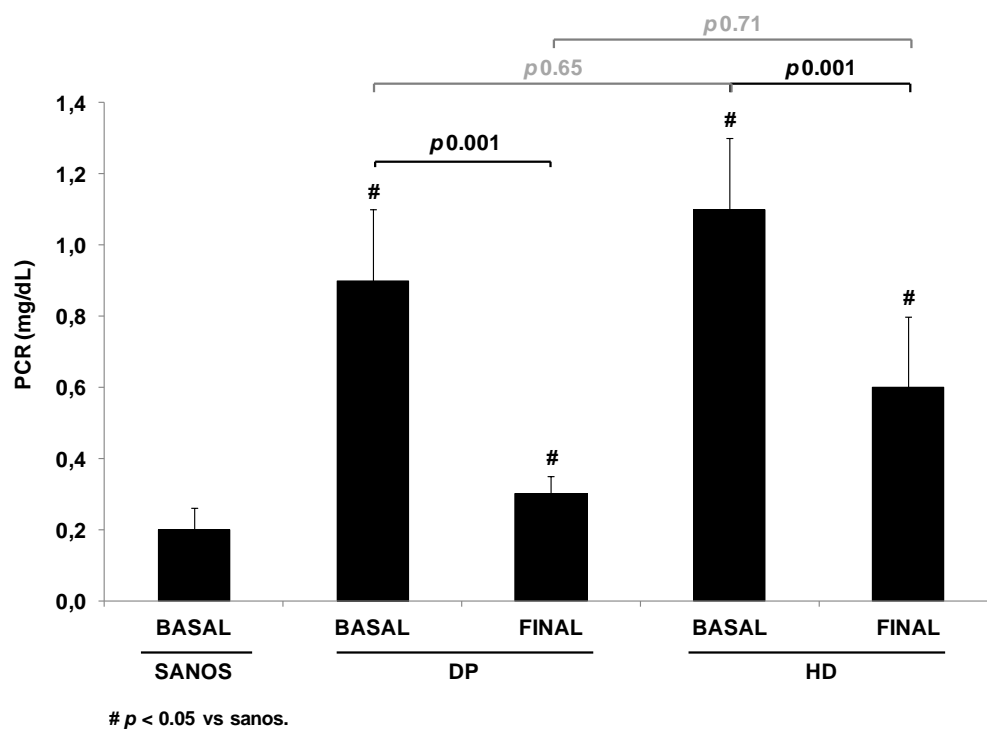


Figura 7. Concentraciones séricas de PCR de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

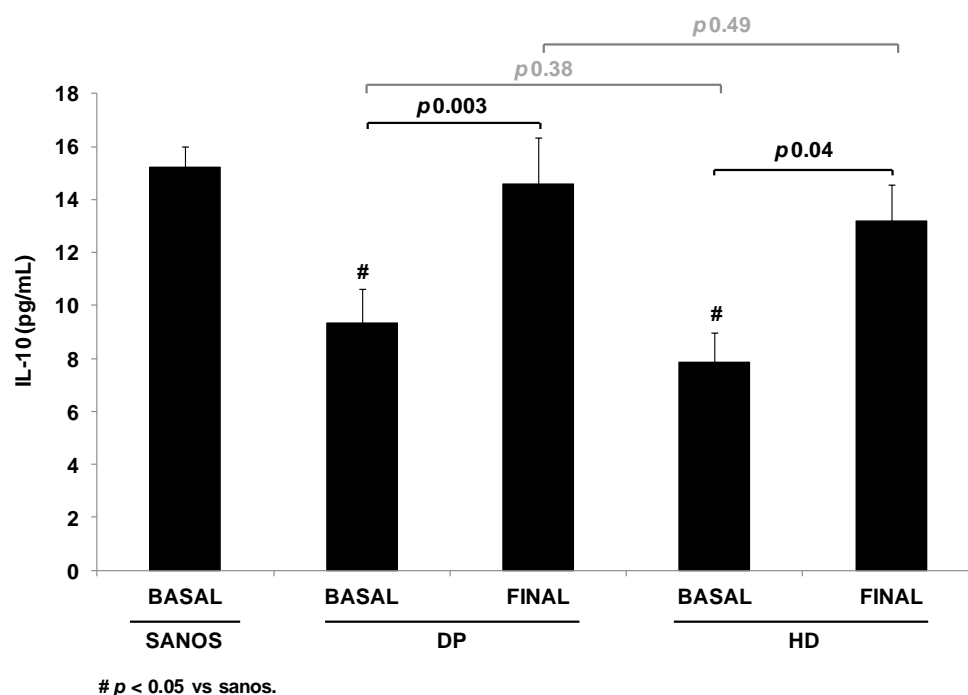


Figura 8. Concentraciones séricas de IL-10 de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

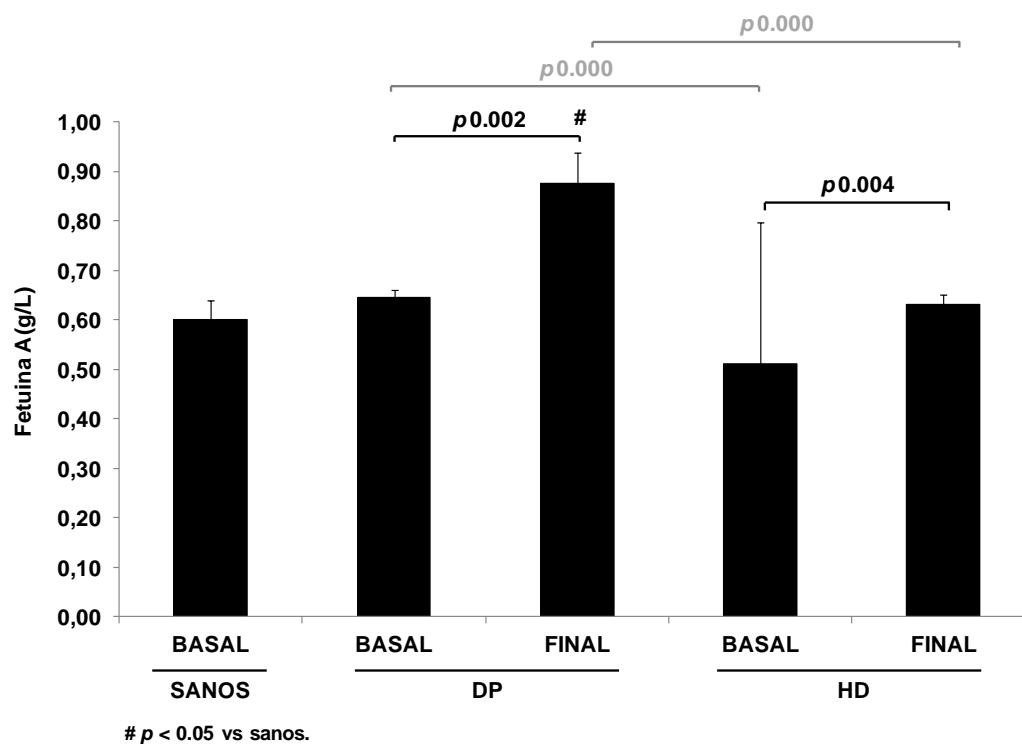


Figura 9. Concentraciones séricas de Fetuina A de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

Tabla 10. Cuantificación de CD16+ y análisis de su sobrenadante post-cultivo de 24 horas de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

VARIABLE	SANOS (n = 17)	DIALISIS PERITONEAL (n = 15)		HEMODIALISIS (n = 15)	
		Basal	Final	Basal	Final
CD16+ (L x10 ³ /μl)	0.61 ± 0.33	1.35 ± 0.81*	0.85 ± 0.52	1.30 ± 0.63*	1.10 ± 0.54*
IL-6 (pg/mL)	154 (50-439)	619 (522-624)*	176 (89-503)§	481 (172-619)*	160 (84-251)§
TNF-alfa (pg/mL)	162 (90-326)	295 (191-656)	163 (78-466)	471 (317-650)*	187 (119-326)§

* $p < 0.05$ vs sanos; § $p < 0.05$ vs evaluación basal del mismo grupo.

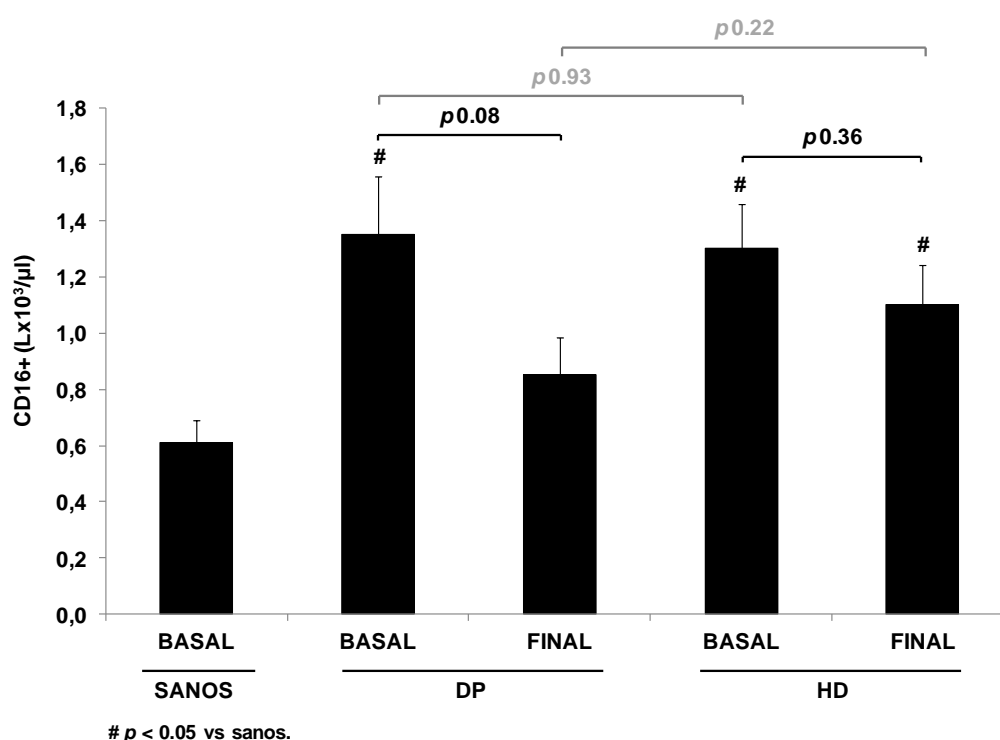


Figura 10. Cuantificación de Mos CD16+ en sangre periférica de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

Cuando se calculó el porcentaje que representan los CD16+ respecto a la población total de Mos, hubo una disminución progresiva y significativa durante el seguimiento en ambos grupos de diálisis (**Figura 11**). A pesar de que el grupo de HD presentó un porcentaje significativamente mayor de esta subpoblación de Mos al inicio del estudio, fue el que tuvo el mayor descenso porcentual; no obstante que ninguno de los dos grupos en

diálisis alcanzó las cifras porcentuales encontradas al final del seguimiento en los controles sanos (cifras no presentes en la figura; ~9%). Por otro lado, si se considera a la población de sujetos estudiados de acuerdo a la presencia o no de inflamación (definida de acuerdo al conteo de CD16+ ≥ 0.9 miles/mm³ x 10³) los pacientes en diálisis presentaron inflamación 2-3 más que lo observado en sujetos sanos al inicio del estudio. Interesantemente, al final del seguimiento, ambos grupos de pacientes en diálisis disminuyeron el porcentaje de sujetos con inflamación, aunque no alcanzaron la de los controles sanos (**Figura 12**).

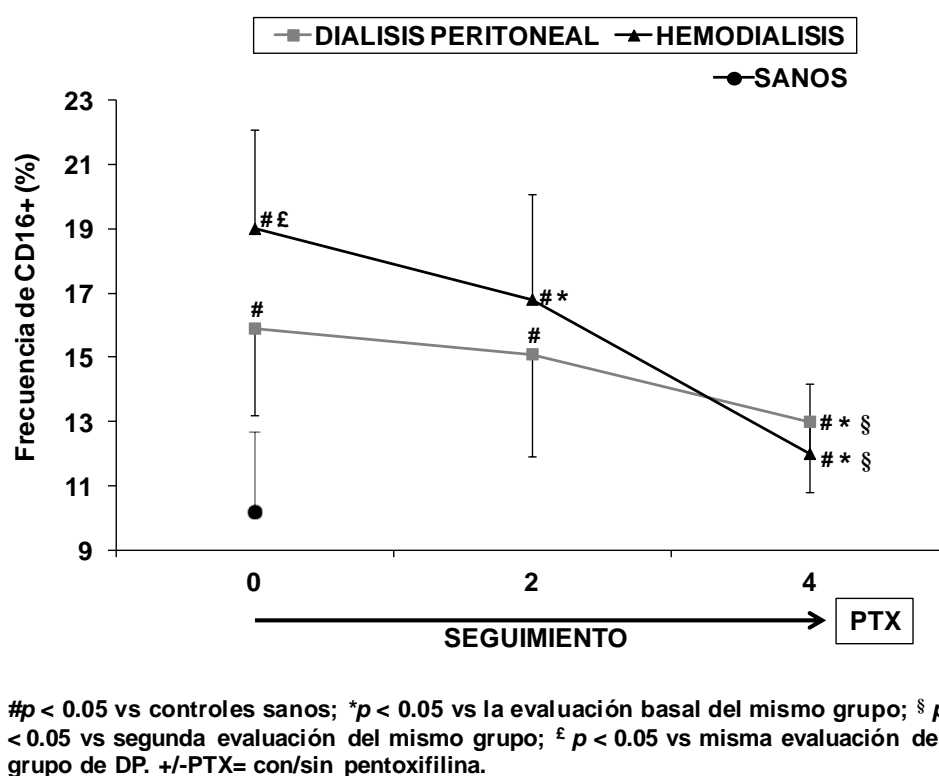


Figura 11. Frecuencia de CD16+ a partir de la población total de Mos entre los pacientes en diálisis antes [0 meses, sin PTX] y después del tratamiento [2 y 4 meses, con PTX].

La capacidad secretora de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- α) en el sobrenadante de los Mos CD16+ extraídos de los pacientes con DP y HD antes y después del tratamiento con PTX se muestra en la **Tabla 10** y las **Figuras 13 y 14**. Al inicio del estudio, se encontraron niveles significativamente mayores, tanto de IL-6 como de TNF- α en

los grupos de diálisis, superando 2-4 veces los valores encontrados en sujetos sanos. Al final del seguimiento, estas cifras disminuyeron significativamente en ambos grupos, con excepción del TNF- α , que aunque disminuyó, no alcanzó significancia estadística. También se midieron las concentraciones en el sobrenadante de CD16+ de la IL-10, pero su presencia no fue detectada antes ni después de la PTX con el método utilizado (ELISA).

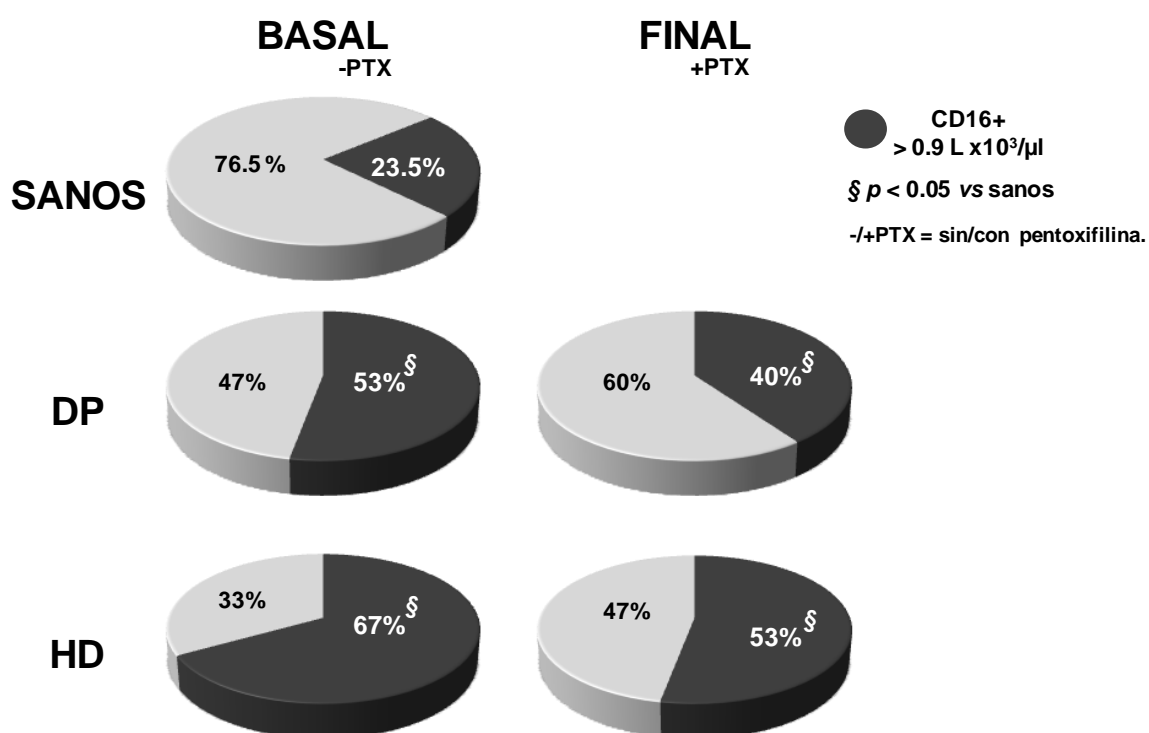


Figura 12. Porcentaje de sujetos con micro-inflamación dependiente de CD16+ (>0.9 miles/mm³ x 10³) de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

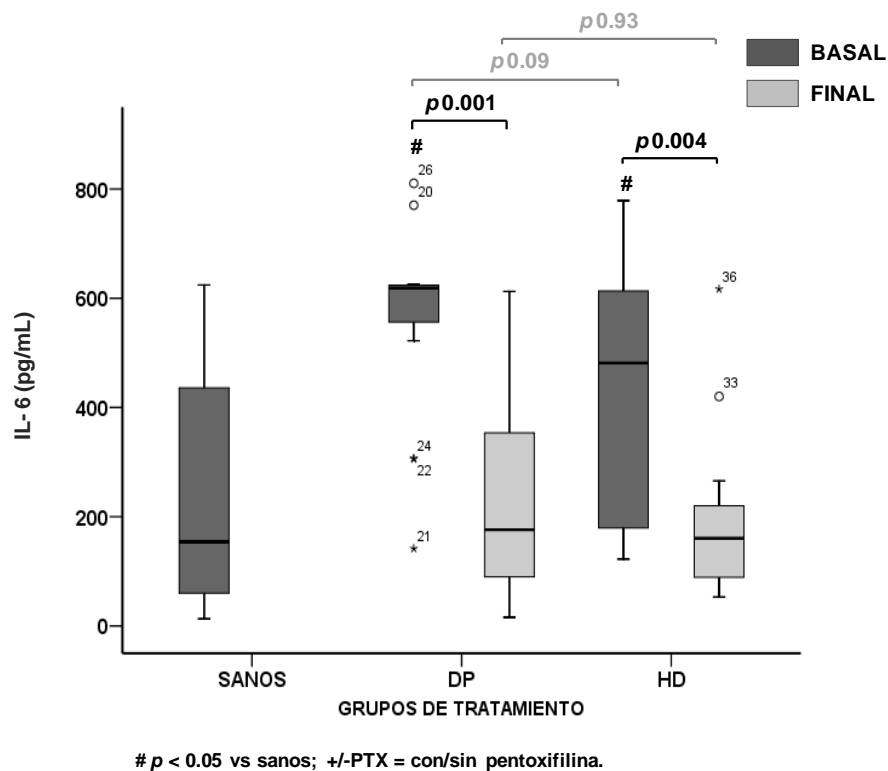


Figura 13. Concentraciones de IL-6 en sobrenadante post-cultivo de 24 horas de CD16+ en los grupos de DP y HD antes y después del tratamiento con PTX.

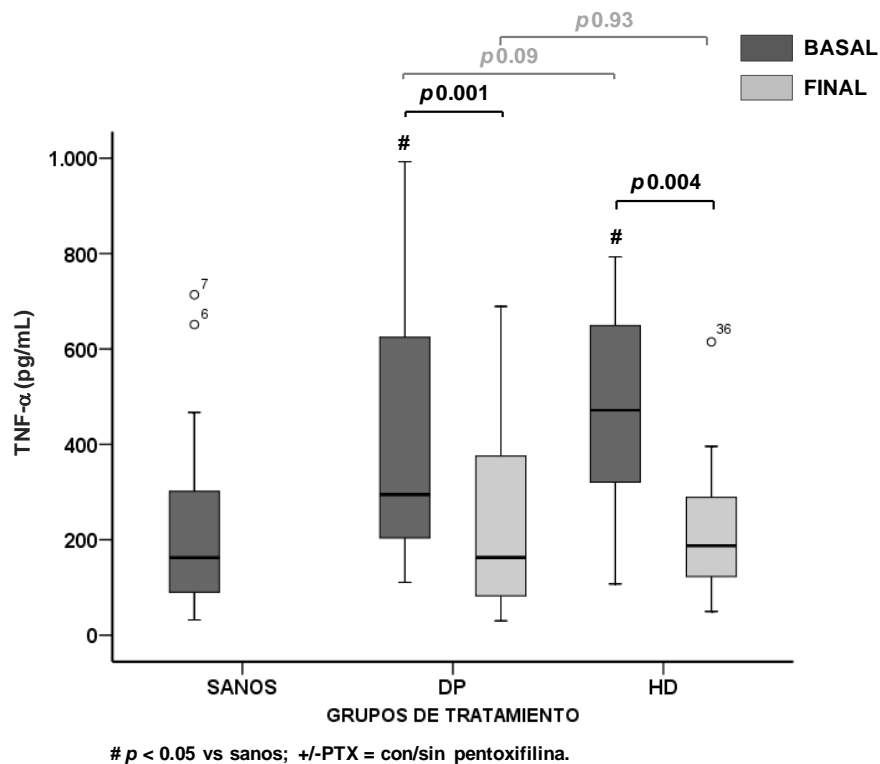


Figura 14. Concentraciones de TNF-α en sobrenadante post-cultivo de 24 horas de CD16+ en los grupos de DP y HD antes y después del tratamiento con PTX.

Resultados de marcadores de DE en sangre periférica de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.

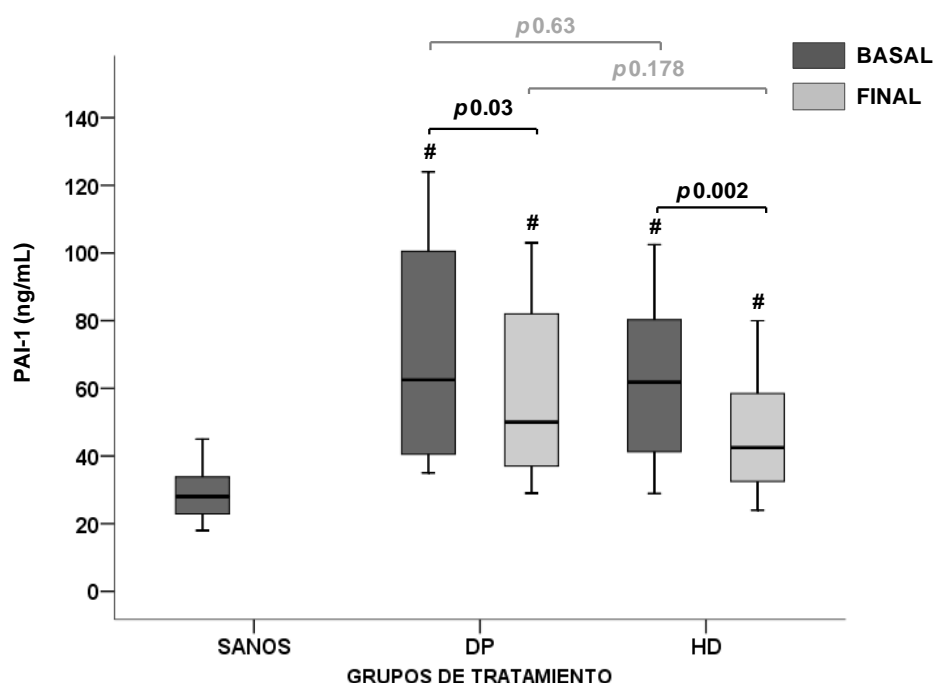
La **Figura 15** muestra las concentraciones plasmáticas de PAI-1 en sangre periférica de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs los controles sanos sin tratamiento. Se observó que las concentraciones séricas de PAI-1 fueron significativamente mayores tanto al inicio como al final del seguimiento en ambos grupos de diálisis en comparación a sujetos sanos, pero al final de seguimiento, el uso de la PTX logró disminuir las concentraciones plasmáticas de PAI-1 en ambos grupos de diálisis sin igualar a las de los controles sanos.

La **Figura 16** muestra las concentraciones plasmáticas de TM en sangre periférica de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento. Las concentraciones plasmáticas de TM fueron menores antes y después del tratamiento que los sujetos sanos; después del tratamiento con PTX, estas cifras se incrementaron significativamente en los sujetos en diálisis.

Las **Figuras 17 y 18** muestran las concentraciones plasmáticas de Lp(a) y Hcy respectivamente, en sangre periférica entre los grupos con diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento. Ambos marcadores tuvieron un comportamiento similar al mostrar unas concentraciones significativamente mayores antes y después del tratamiento que los sujetos sanos, particularmente en el caso de los sujetos en HD. Después del tratamiento con PTX, las cifras de Lp(a) decrecieron significativamente sólo en el grupo de HD, mientras que las determinaciones de Hcy decrecieron significativamente en ambos grupos.

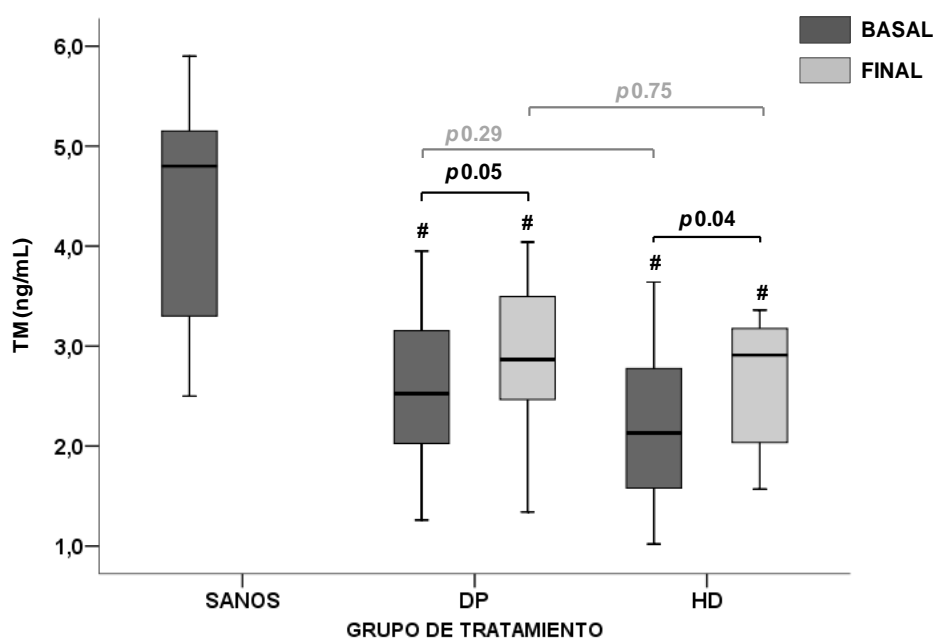
Las **Figuras 19 y 20** muestran las concentraciones plasmáticas de VCAM-1 y MCP-1, respectivamente, en sangre periférica de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento. Las concentraciones plasmáticas de ambos marcadores fueron significativamente mayores, tanto al inicio como al final del tratamiento, en ambos grupos de diálisis respecto a los sujetos sanos. Después del tratamiento con PTX, sus concentraciones decrecieron significativamente al final del estudio en ambos grupos en diálisis, aunque no igualaron a las de los sujetos sanos.

Las **Figuras 21 a la 23** muestra las concentraciones plasmáticas de factores de crecimiento en sangre periférica de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento. Las concentraciones plasmáticas de VEGF (**Figura 21**) tendieron a ser mayores tanto al inicio como al final del estudio en ambos grupos de diálisis en comparación a los sujetos sanos, pero disminuyeron significativamente post-tratamiento con PTX, sin llegar a ser diferentes a las de los controles sanos. Las concentraciones plasmáticas basales de TGF- β 1 (**Figura 22**), fueron significativamente menores en ambos grupos de diálisis antes y después del tratamiento con PTX en comparación a los sujetos sanos, aunque tendieron a incrementarse después del tratamiento con PTX en ambos grupos (sin diferencia entre los grupos). Las concentraciones basales de PDGF (**Figura 23**), por su parte, aunque tendieron a ser mayores antes y después del tratamiento que las de los sujetos sanos y disminuyeron después del uso de PTX, no fueron diferentes significativamente a las cifras de sujetos sanos.



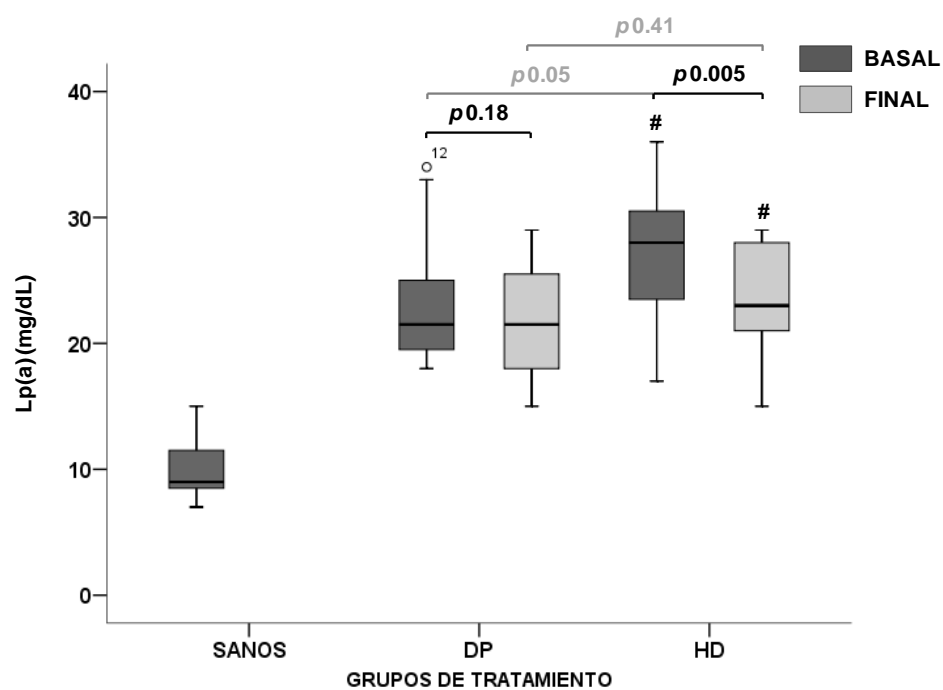
$p < 0.05$ vs sanos; PAI-1 = inhibidor del activador del plasminógeno 1; +/- PTX = con/sin pentoxifilina.

Figura 15. Concentraciones plasmáticas de PAI-1 de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.



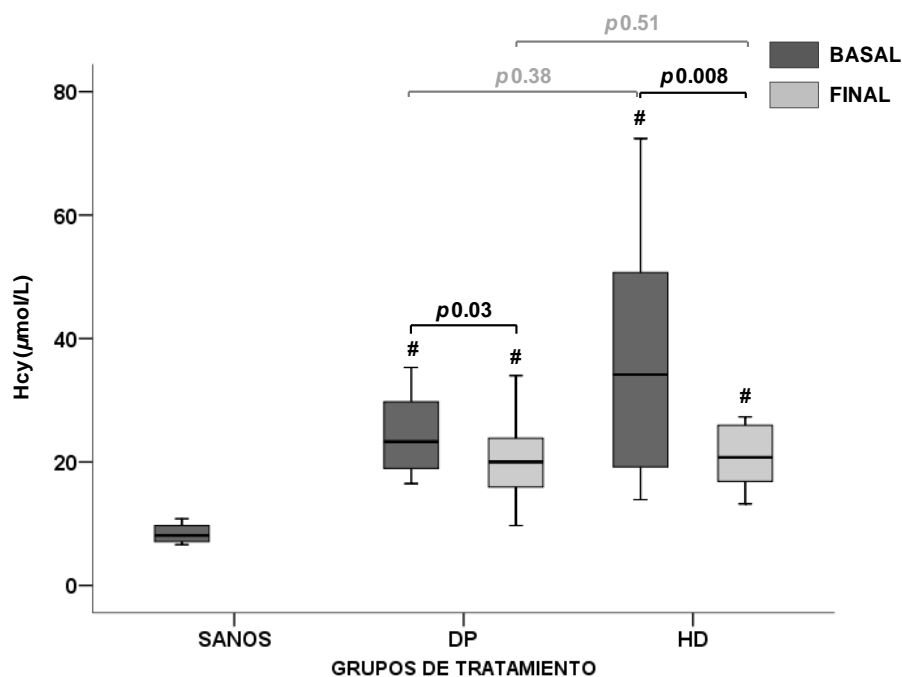
$p < 0.05$ vs sanos; TM = trombomodulina; +/-PTX = con/sin pentoxifilina.

Figura 16. Concentraciones plasmáticas de TM de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.



$p < 0.05$ vs sanos; Lp(a) = lipoproteína a; +/-PTX = con/sin pentoxifilina.

Figura 17. Concentraciones plasmáticas de Lp(a) de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.



$p < 0.05$ vs sanos; Hcy = Homocisteína; +/-PTX = con/sin pentoxifilina.

Figura 18. Concentraciones plasmáticas de Hcy de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

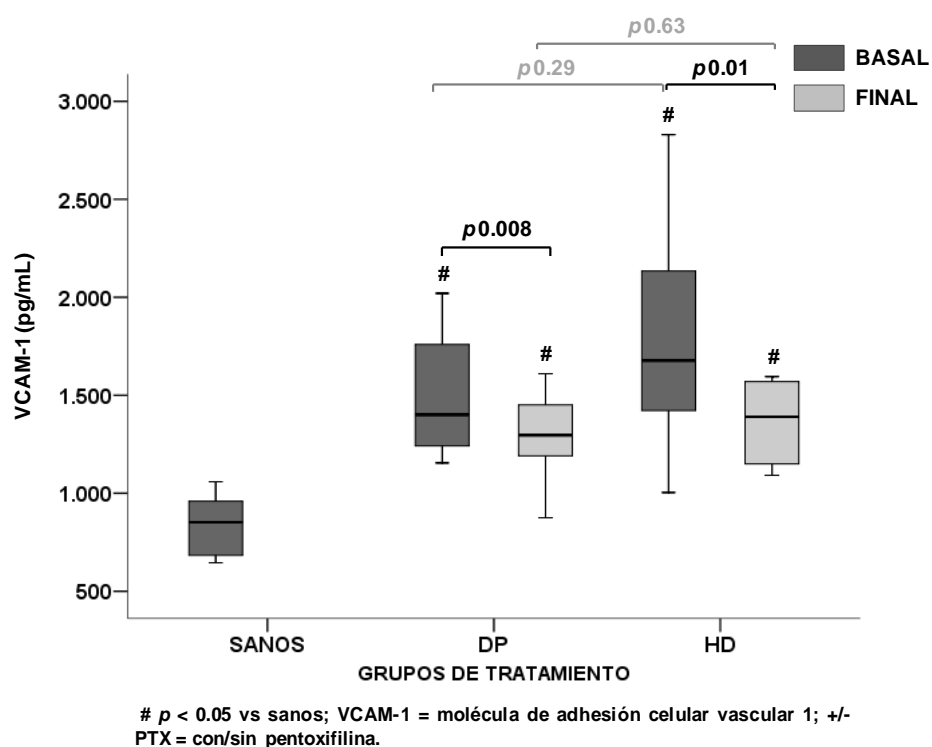


Figura 19. Concentraciones plasmáticas de VCAM-1 de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

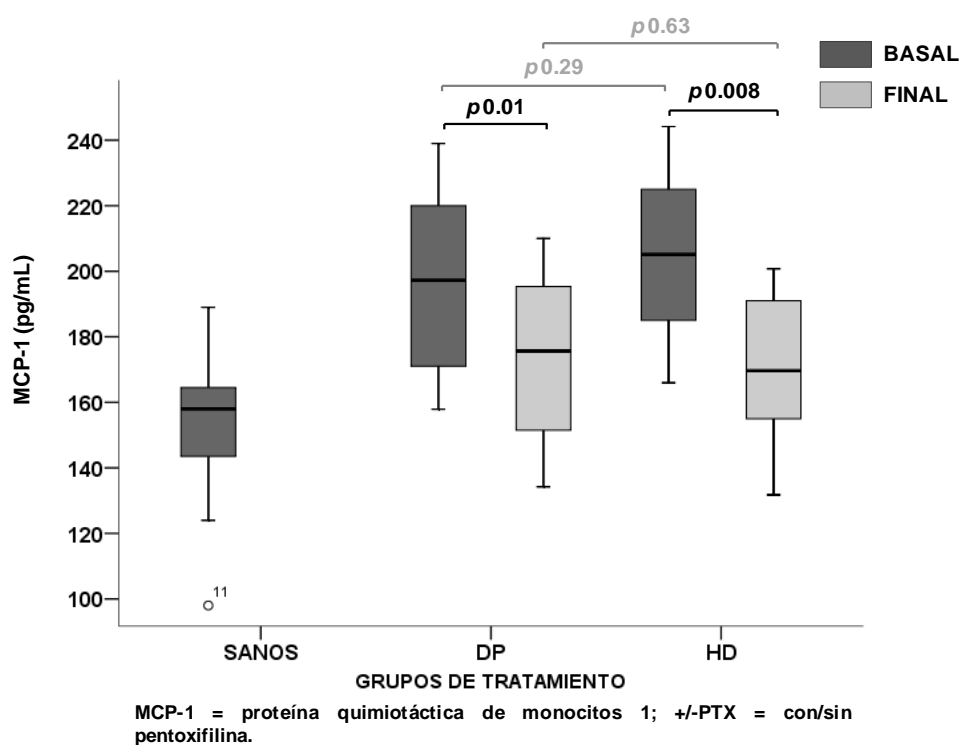


Figura 20. Concentraciones plasmáticas de MCP-1 de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

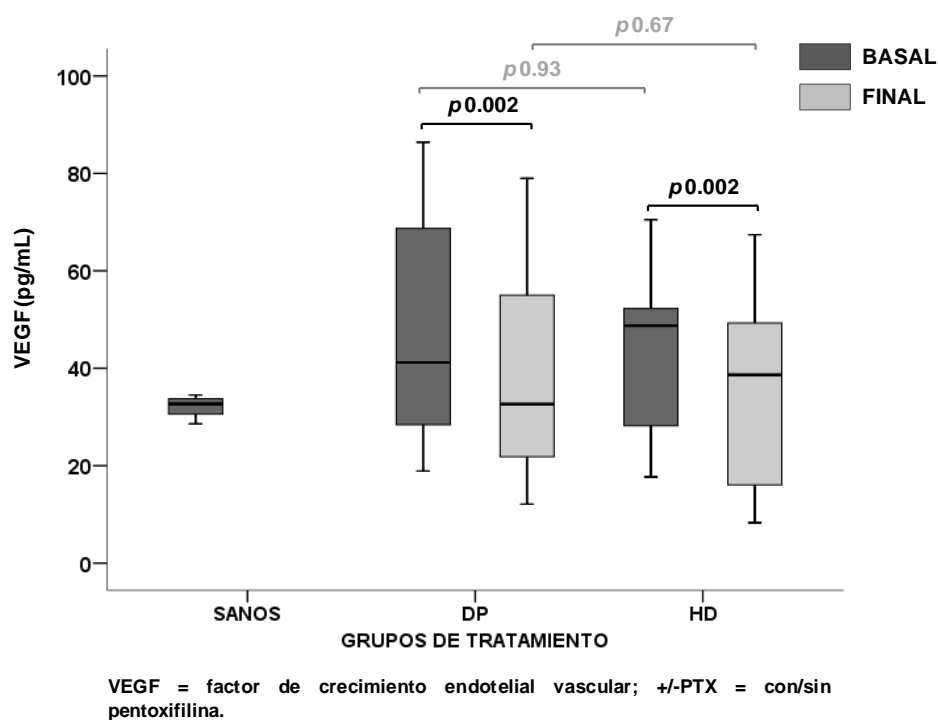


Figura 21. Concentraciones plasmáticas de VEGF de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

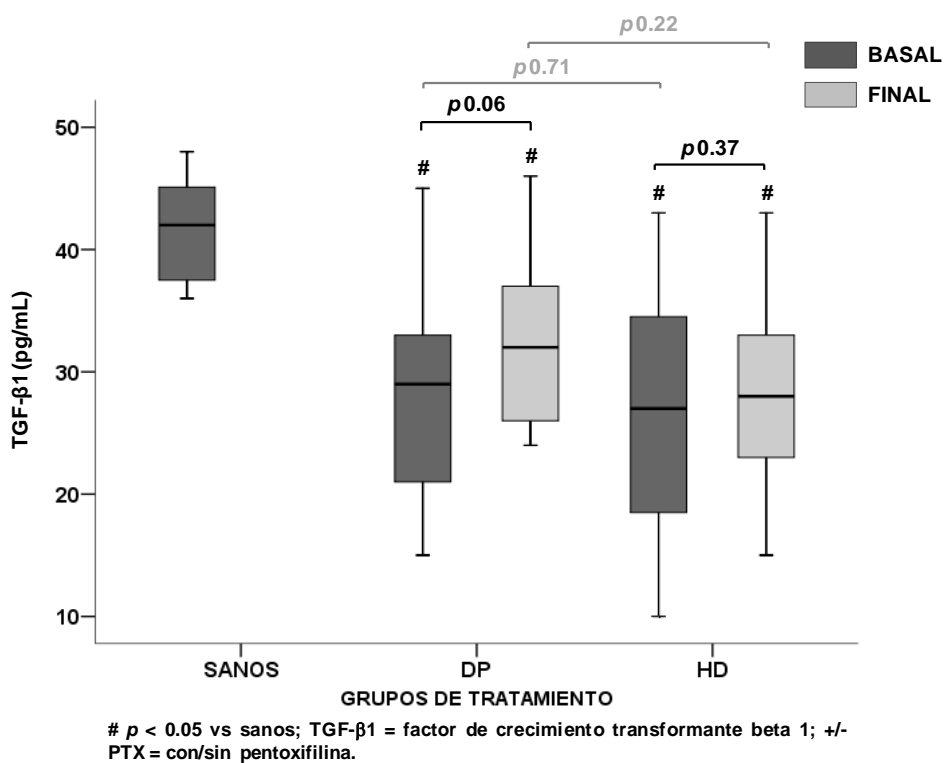


Figura 22. Concentraciones plasmáticas de TGF- β 1 de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

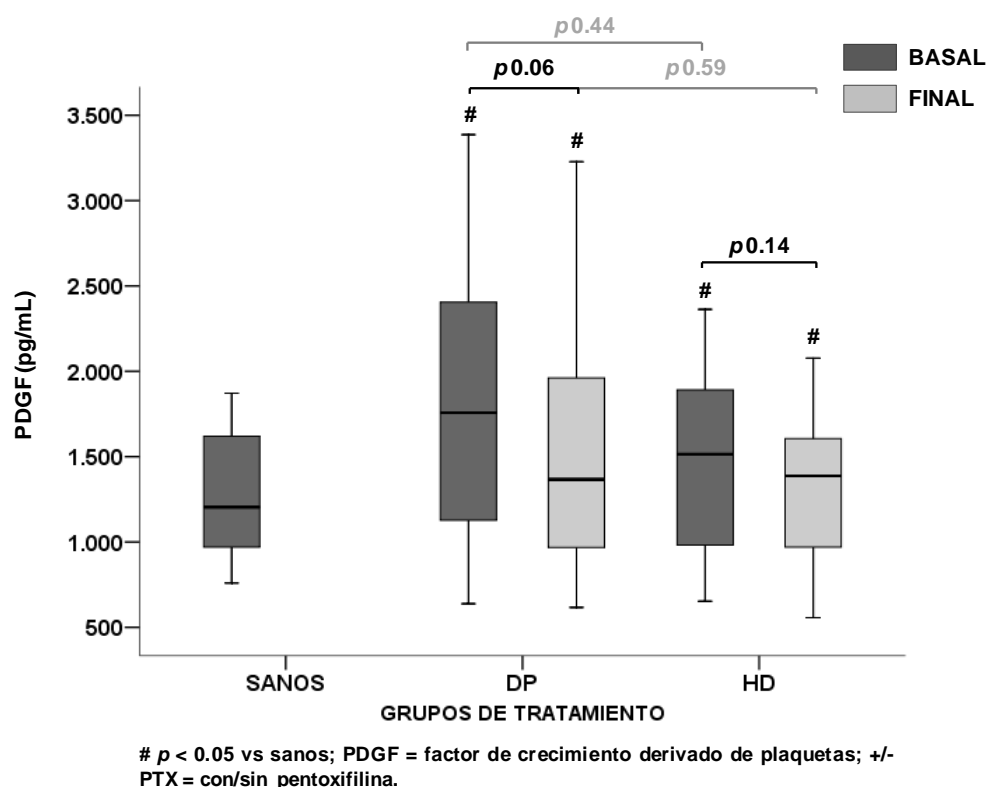


Figura 23. Concentraciones plasmáticas de PDGF de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento.

Resultados de la prueba de VO realizada en pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.

Para expresar de forma más simplificada los resultados de los marcadores de DE determinados antes y después de la prueba de VO se calculó una razón aritmética [post-VO/pre-VO (**Figuras 24 y 25**)]. Así, antes del tratamiento se observó un comportamiento similar en los resultados tanto de t-PA como de NO_3 , con concentraciones significativamente inferiores en ambos grupos de diálisis en comparación a los sujetos sanos. Después del tratamiento con PTX, en ambos grupos de pacientes en diálisis se observó un incremento significativo de las concentraciones de estos dos marcadores.

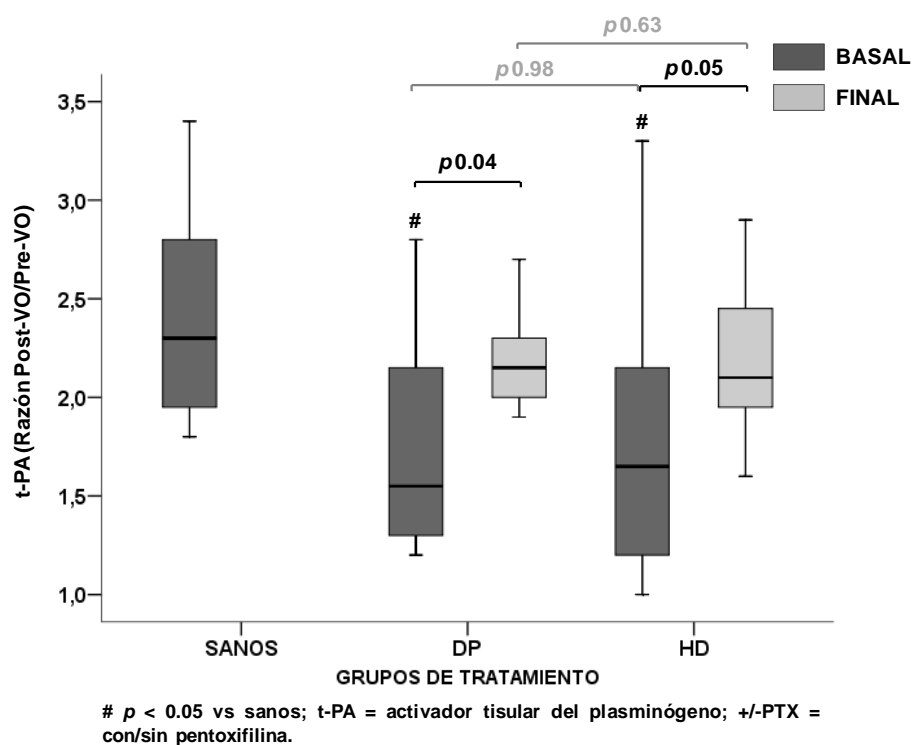


Figura 24. Concentraciones plasmáticas de t-PA (Razón post-VO/pre-VO) en los pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento (valor que se muestra en la parte inferior del gráfico).

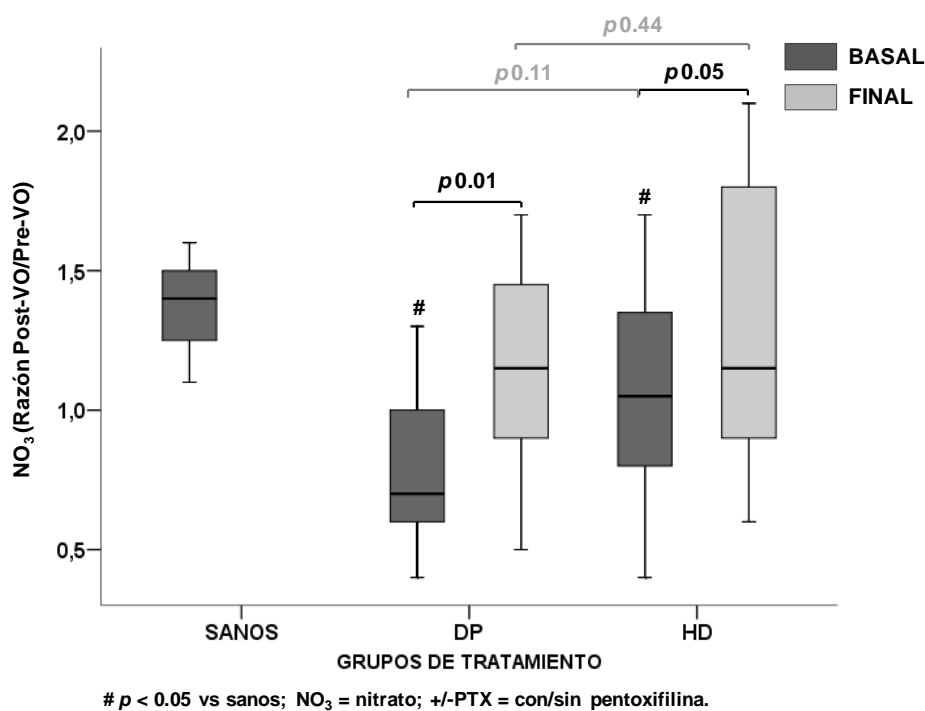


Figura 25. Concentraciones plasmáticas de NO₃ (Razón post-VO/pre-VO) en los pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX vs controles sanos sin tratamiento (valor que se muestra en la parte inferior del gráfico).

Resultados del análisis de correlación entre las variables clínicas de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.

En un análisis adicional, se encontraron diversas correlaciones entre las variables clínicas antes como después del tratamiento con PTX incluyendo todos los pacientes en diálisis.

Las correlaciones significativas entre las variables clínicas de pacientes con IRCT en diálisis **antes** del tratamiento con PTX fueron una correlación positiva entre los CD16+ y los Mos totales ($r = 0.9$; $p < 0.00$), así como una correlación negativa entre TNF- α y albúmina ($r = -0.4$; $p 0.03$).

Las significativas entre las variables clínicas de pacientes con IRCT en diálisis **después** del tratamiento con PTX fueron una correlación positiva entre los CD16+ y Mos totales ($r = 0.9$; 0.00) y entre IL-6 y TNF- α ambas citoquinas en sobrenadante de CD16+ (**Figura 26**). Asimismo, se observó una correlación negativa entre Mos totales y albúmina ($r = -0.05$; $p 0.002$), entre prealbúmina y CD16+ (**Figura 27**), entre albúmina e IL-6 (**Figura 28**), y entre IL-10 y triglicéridos ($r = -0.4$; $p 0.03$).

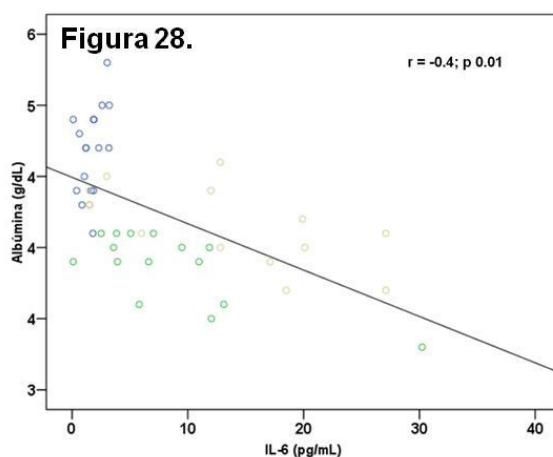
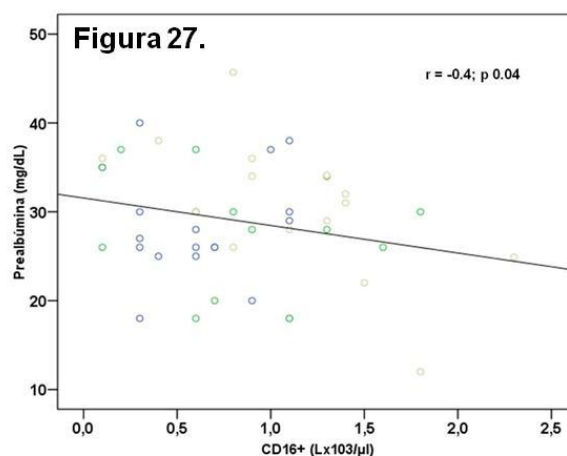
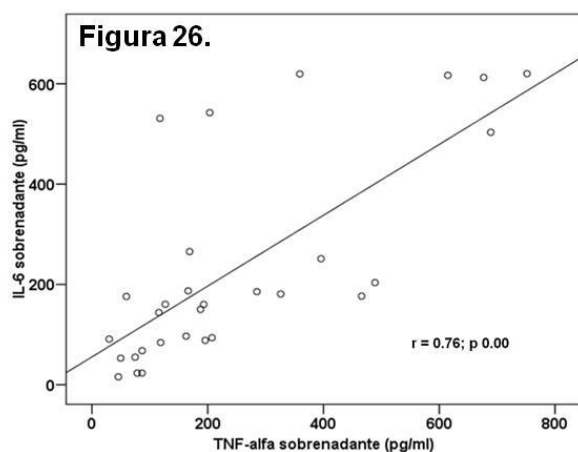


Figura 26. Relación entre las concentraciones de IL-6 y TNF- α de sobrenadante de CD16+ en los pacientes con IRCT en diálisis después del tratamiento con PTX.

Figura 27. Relación entre las concentraciones de prealbúmina y CD16+ en los pacientes con IRCT en diálisis después del tratamiento con PTX.

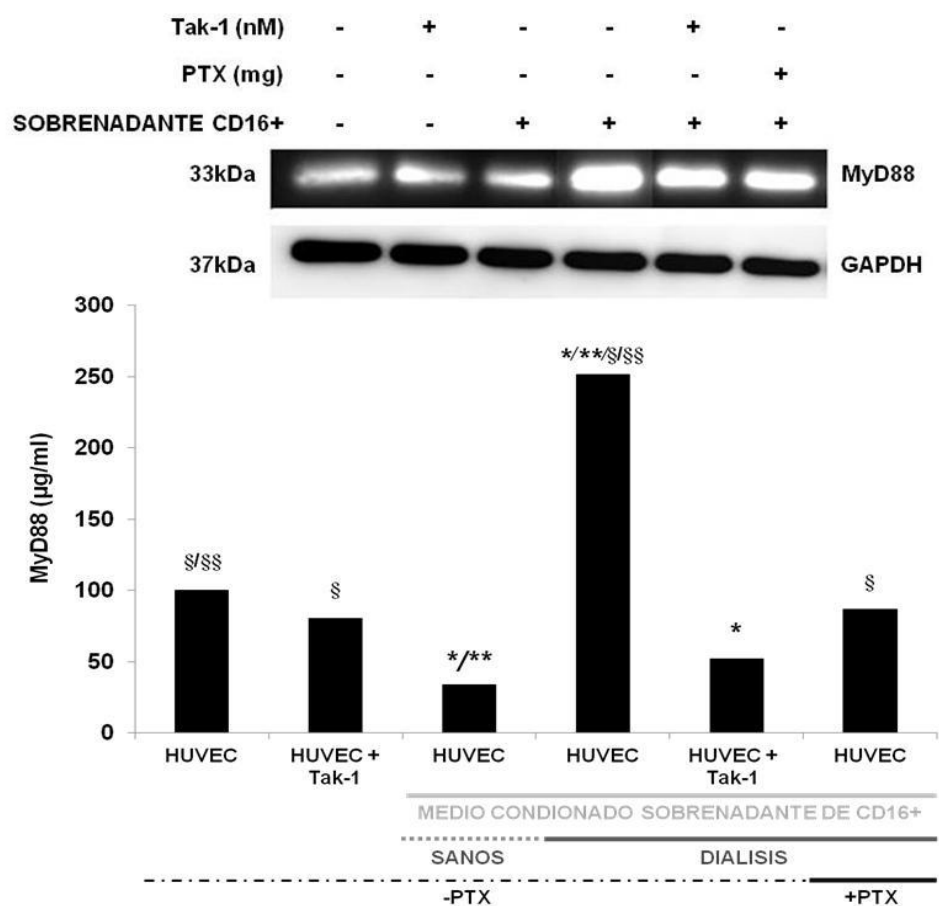
Figura 28. Relación entre las concentraciones de albúmina y IL-6 y en los pacientes con IRCT en diálisis después del tratamiento con PTX.

RESULTADOS *IN VITRO*

Resultados de la expresión de la proteína MyD88 en células HUVEC tratadas o no con el sobrenadante de Mos CD16+ de pacientes con IRCT en diálisis, antes y después del tratamiento con PTX.

En la **Figura 28** se muestra la expresión de la proteína MyD88 (inductor de la activación de NF- κ B) en HUVEC post-cultivo de 24 horas sin tratar (control) y tratadas con un inhibidor de la actividad de NF- κ B, Tak-1 (control negativo) y con medio condicionado de sobrenadante de CD16+ de los pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX, así como de controles sanos sin tratamiento.

Por un lado se observó que la expresión de MyD88 fue significativamente menor en las HUVEC tratadas con medio condicionado de CD16+ de sujetos sanos en comparación a las HUVEC basales (sin tratar) y a las tratadas con el inhibidor Tak-1. Por otro lado, las HUVEC tratadas con medio condicionado de CD16+ de sujetos con IRCT en diálisis antes del tratamiento con PTX, expresaron un llamativo incremento de MyD88, mientras que hubo una disminución significativa de la expresión de MyD88, en las HUVEC tratadas con el inhibidor Tak-1, así como en las HUVEC tratadas sólo con medio condicionado de CD16+ de pacientes con IRCT en diálisis que recibieron PTX.



* $p < 0.05$ vs basal; ** $p < 0.05$ vs HUVEC+Tak-1; § $p < 0.05$ vs HUVEC + Sobrenadante CD16+ sanos y; § § $p < 0.05$ vs HUVEC + Sobrenadante CD16+ diálisis + Tak-1. PTX= pentoxifilina.

Figura 28. Expresión de MyD88 en HUVEC sin tratar y tratadas con Tak-1 y con medio condicionado (sobrenadante de CD16+ de controles sanos sin tratar y pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX).

Resultados del efecto de la PTX sobre los niveles de NO₂ y la expresión de iNOS en HASMC estimuladas con IL-1 β .

Los siguientes resultados *in vitro* se analizaron como media \pm EEM y se muestran en porcentaje frente a los valores expresados por los controles positivos (IL-1 β o TNF- α).

Las **Figuras 29** a la **31** muestran los niveles de nitritos (NO₂) en HASMC estimuladas con IL-1 β a tres concentraciones: 2.5 (29), 5 (30) y 10 (31) ng/ml; y con PTX a dos diferentes concentraciones: 1 y 10 mg/ml; Los valores obtenidos de las HASMC tratadas sólo con PTX no fueron estadísticamente diferentes a los basales. Como era de esperarse, la IL-1 β incrementó significativamente los niveles de NO₂ en comparación con los valores basales en las 3 concentraciones, pero no mostró un efecto dosis dependiente. Cuando las HASMC fueron estimuladas con IL-1 β a las concentraciones de 2.5 y 5 ng/ml, la PTX no modificó los niveles de NO₂. Por otro lado, con la estimulación de IL-1 β a la concentración de 10 ng/ml y con la dosis de 1mg/ml de PTX sí se logró una disminución significativa de los niveles de NO₂.

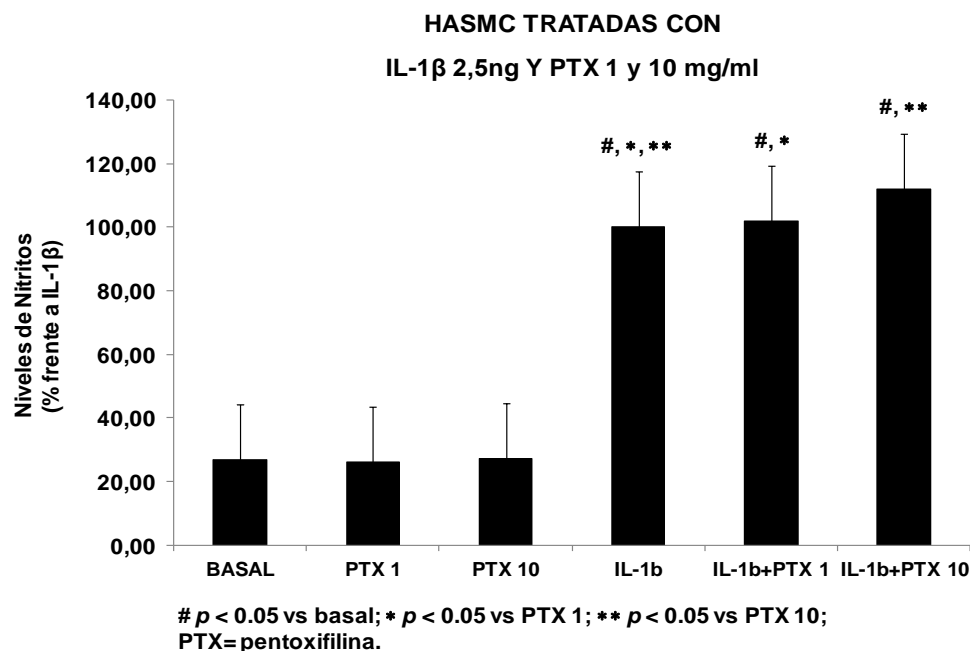


Figura 29. Niveles de NO₂ en HASMC estimuladas con IL-1B (2,5 ng/ml) y tratadas con PTX (1 y 10 mg/ml).

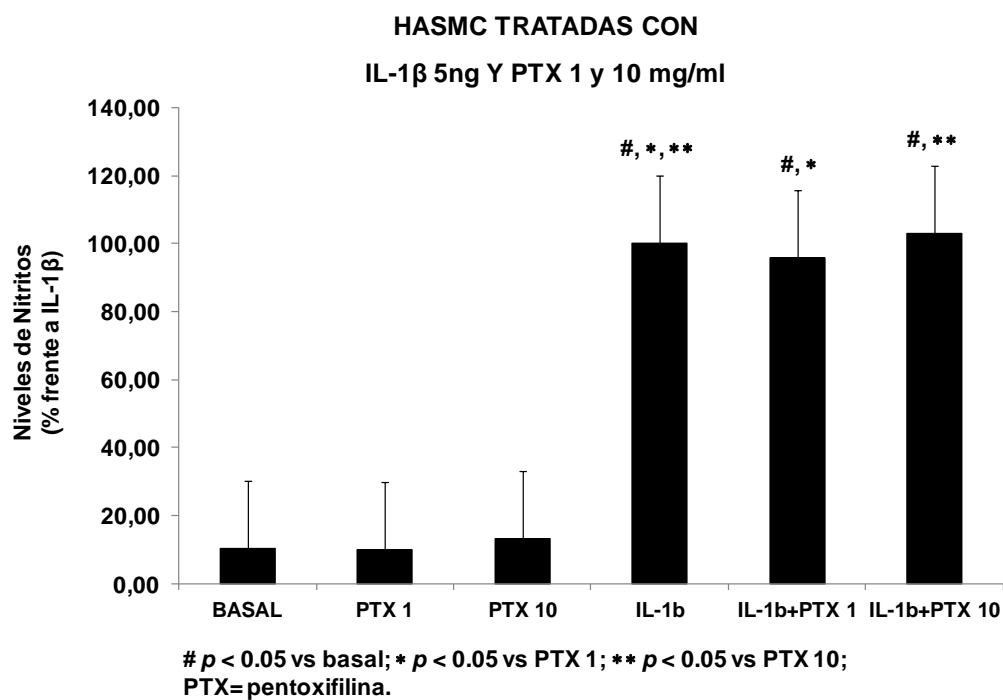


Figura 30. Niveles de NO₂ en HASMC estimuladas con IL-1B (5 ng/ml) y tratadas con PTX (1 y 10 mg/ml).

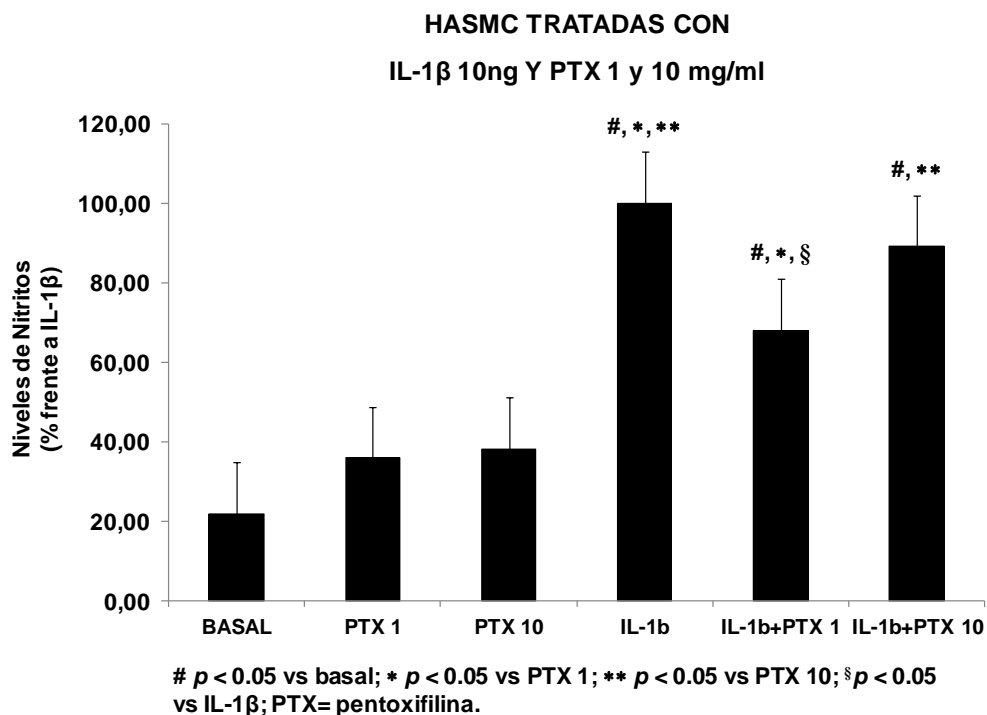


Figura 31. Niveles de NO₂ en HASMC estimuladas con IL-1B (10 ng/ml) y tratadas con PTX (1 y 10 mg/ml).

Las **Figuras 32 a 34** muestran la expresión de iNOS en HASMC estimuladas con IL-1 β a tres concentraciones: 2.5 (**Figura 32**), 5 (**Figura 33**) y 10 (**Figura 34**) ng/ml; y de PTX a diferentes concentraciones: 1, 10 y 100 mg/ml. También es este caso, la IL-1 β , a las tres concentraciones utilizadas, mostró un significativo incremento en la expresión de iNOS en comparación con los valores basales. Contrario a lo que ocurrió en el experimento anteriormente descrito del efecto de PTX sobre los niveles de NO₂ en HASMC, la PTX sólo disminuyó la expresión de iNOS a la concentración más baja de IL-1 β (2.5ng/ml) como de PTX (1mg/ml).

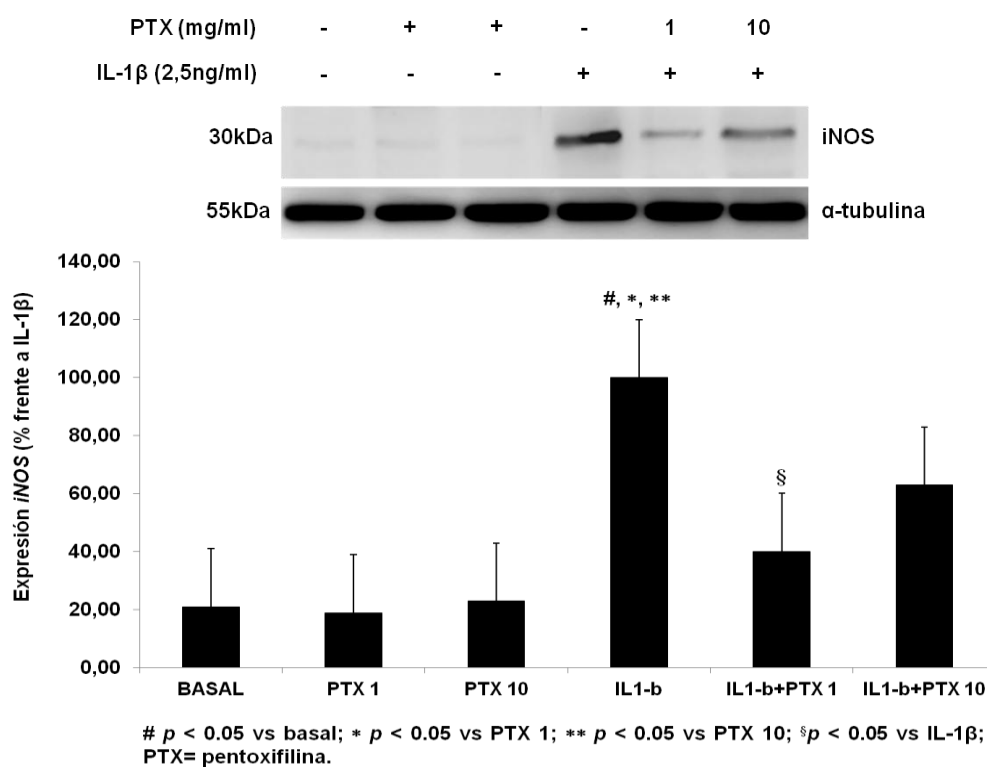


Figura 32. Expresión de *iNOS* en HASMC con IL-1B (2,5 ng/ml) y PTX (1 y 10mg/ml)

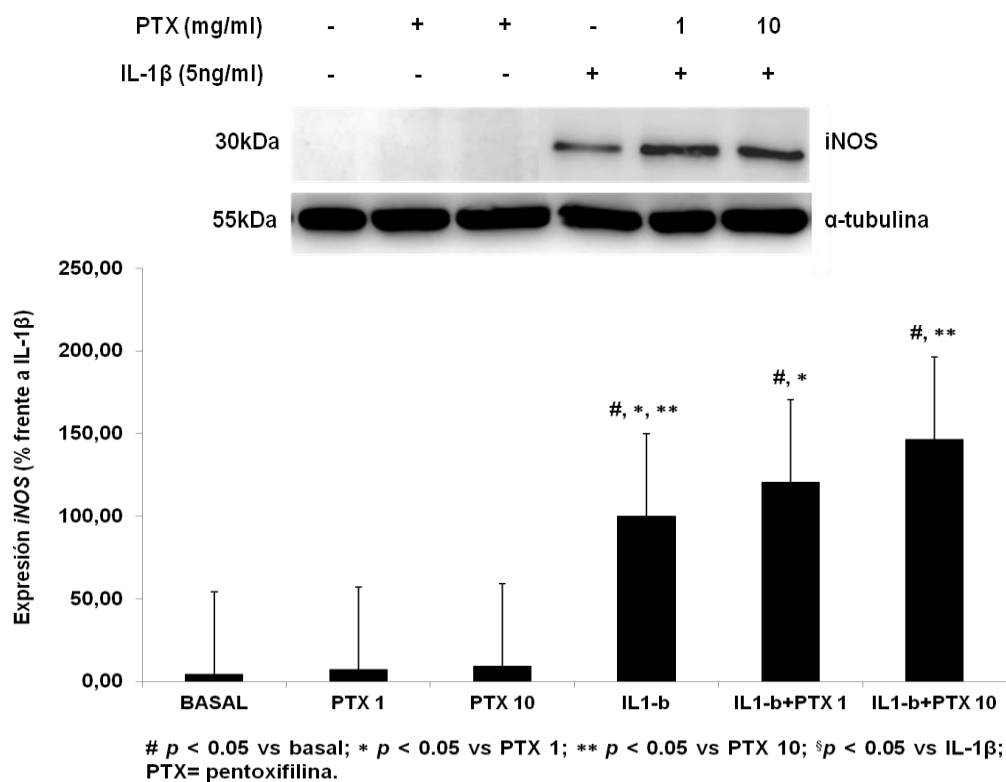


Figura 33. Expresión de *iNOS* en HASMC con IL-1B (5 ng/ml) y PTX (1 y 10 mg/ml)

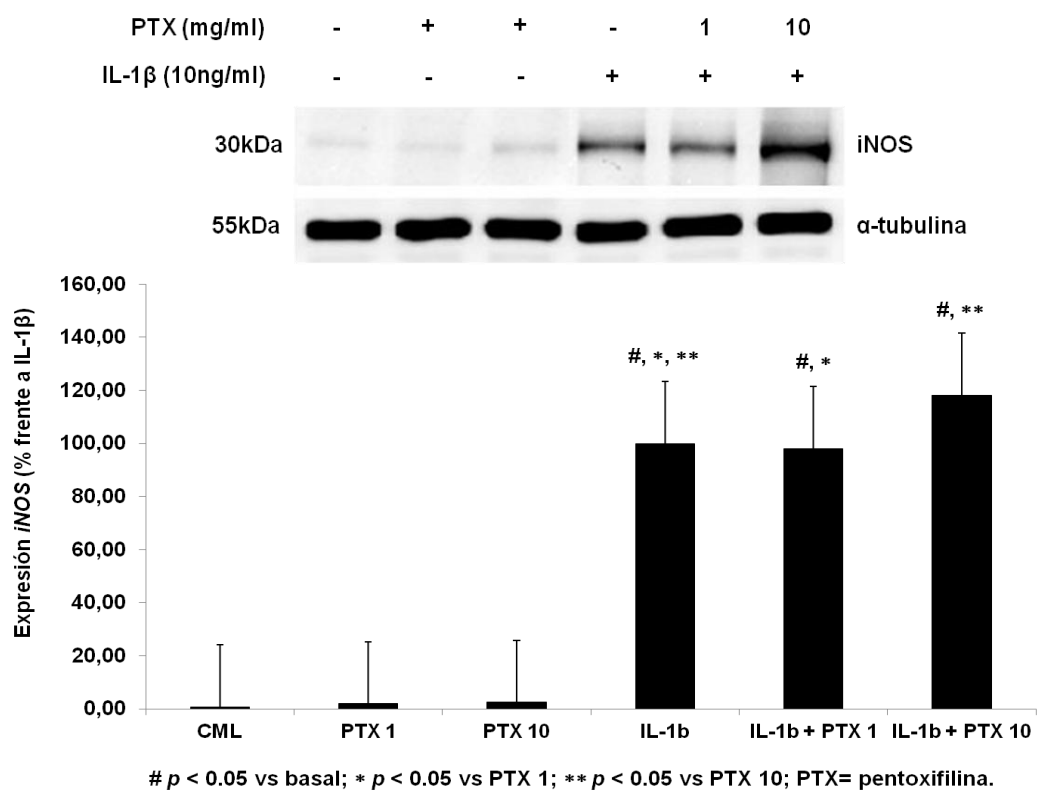


Figura 34. Expresión de *iNOS* en HASMC con IL-1B (10 ng/ml) y PTX (10 y 100 mg/ml)

Resultados del efecto de la PTX sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en HUVEC estimuladas con IL-1 β y TNF- α .

La concentración de CAM en HUVEC estimuladas con IL-1 β y TNF- α y tratadas con PTX se muestran en las **Figuras 35 y 36** (ICAM-1) y **Figuras 37 y 38** (VCAM-1). Los valores obtenidos de VCAM-1 e ICAM-1 en las HUVEC tratadas sólo con PTX no fueron estadísticamente diferentes de los basales (HUVEC sin tratar).

Tanto IL-1 β como TNF- α incrementaron significativamente la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en comparación con sus valores basales respectivos. Interesantemente, la PTX redujo significativamente la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida por IL-1 β y TNF- α , excepto en el caso del VCAM-1 inducido por TNF- α , en donde la PTX tendió a la disminución de la expresión pero el cambio no fue estadísticamente significativo.

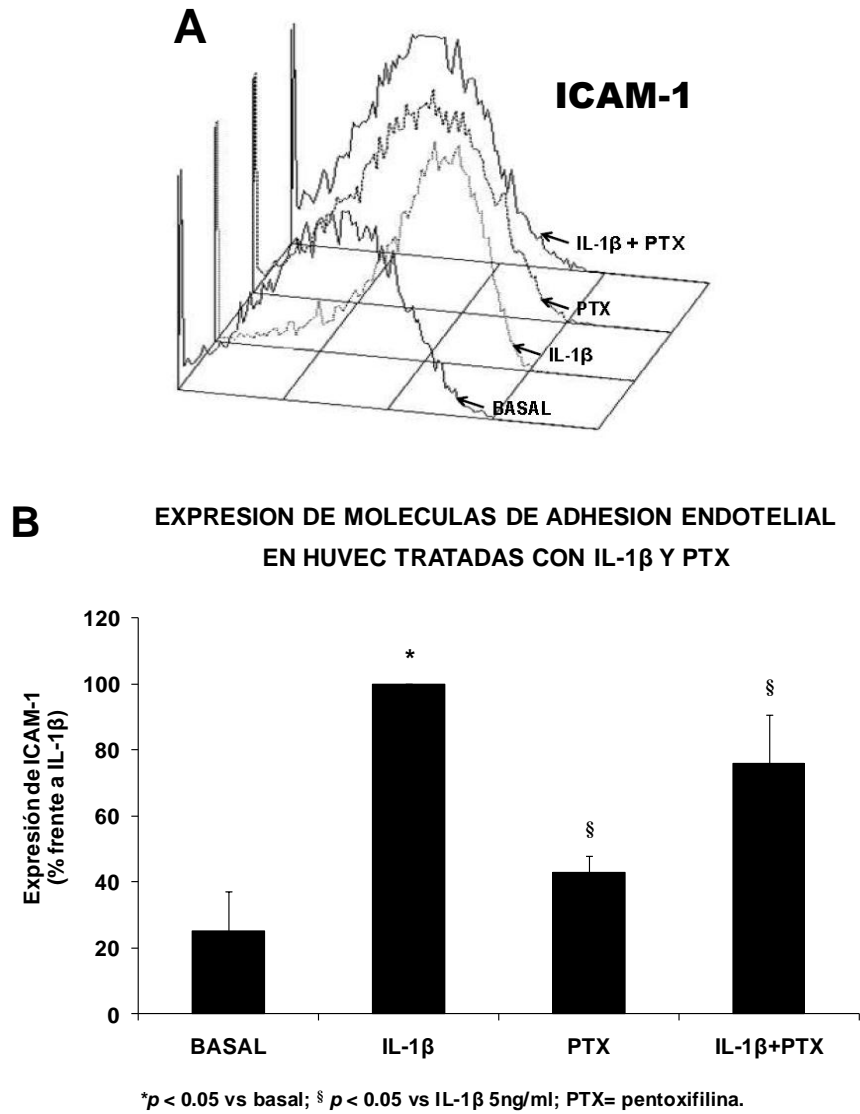


Figura 35. Expresión de ICAM-1 en HUVEC estimuladas con IL-1 β (5 ng/ml) y tratadas con PTX (1 mg/ml).

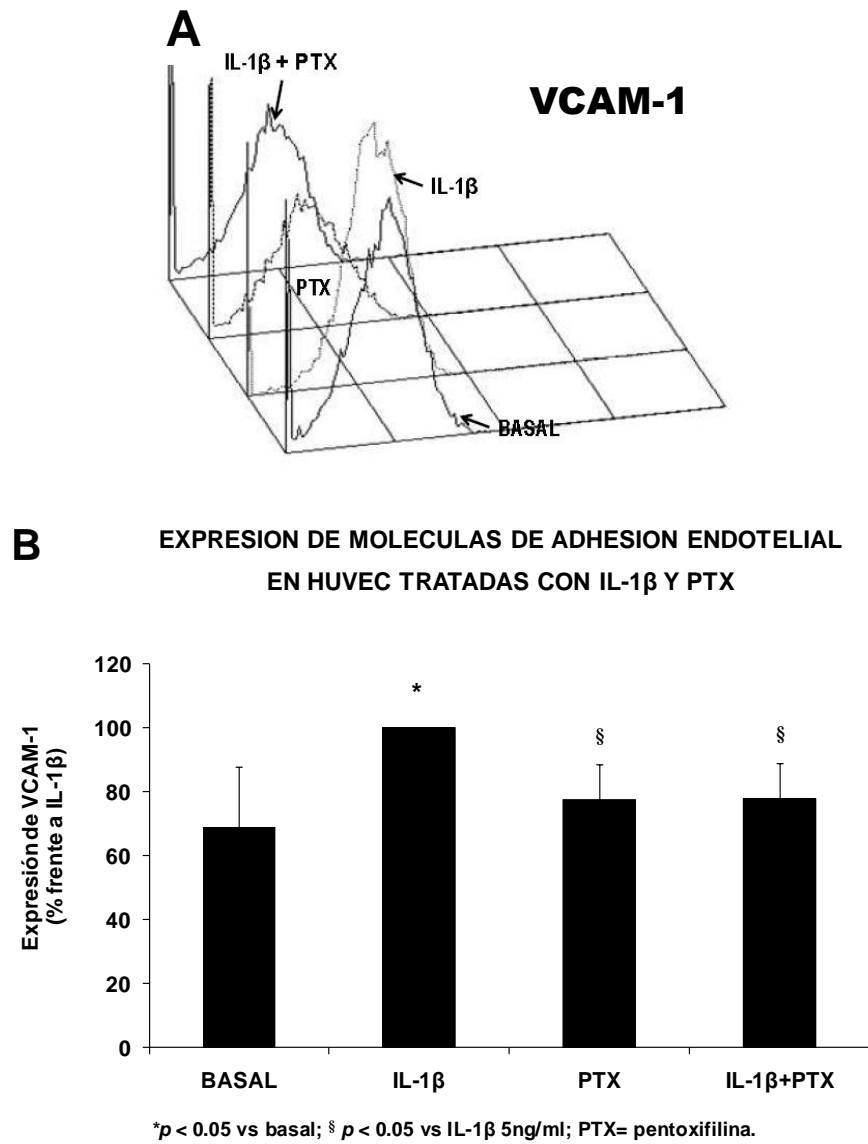


Figura 36. Expresión de VCAM-1 en HUVEC estimuladas con IL-1 β (5 ng/ml) y tratadas con PTX (1 mg/ml).

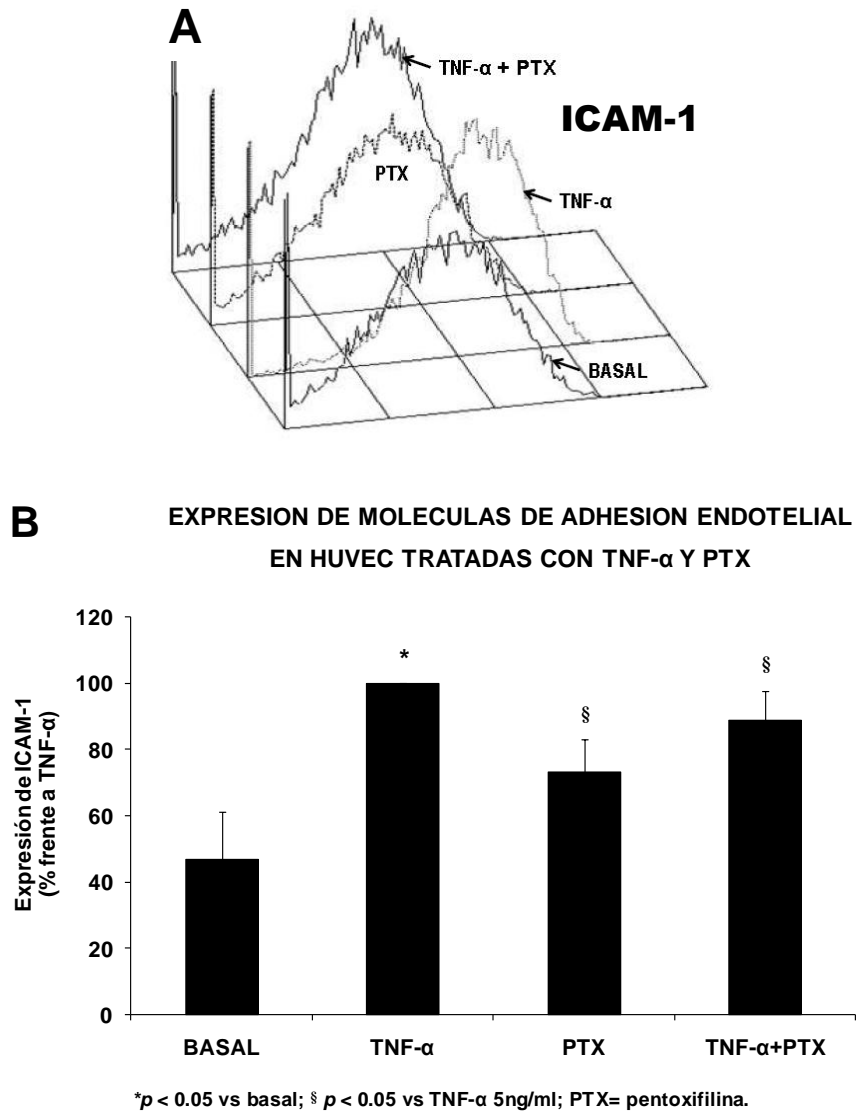


Figura 37. Expresión de ICAM-1 en HUVEC estimuladas con TNF- α (5 ng/ml) y tratadas con PTX (1 mg/ml).

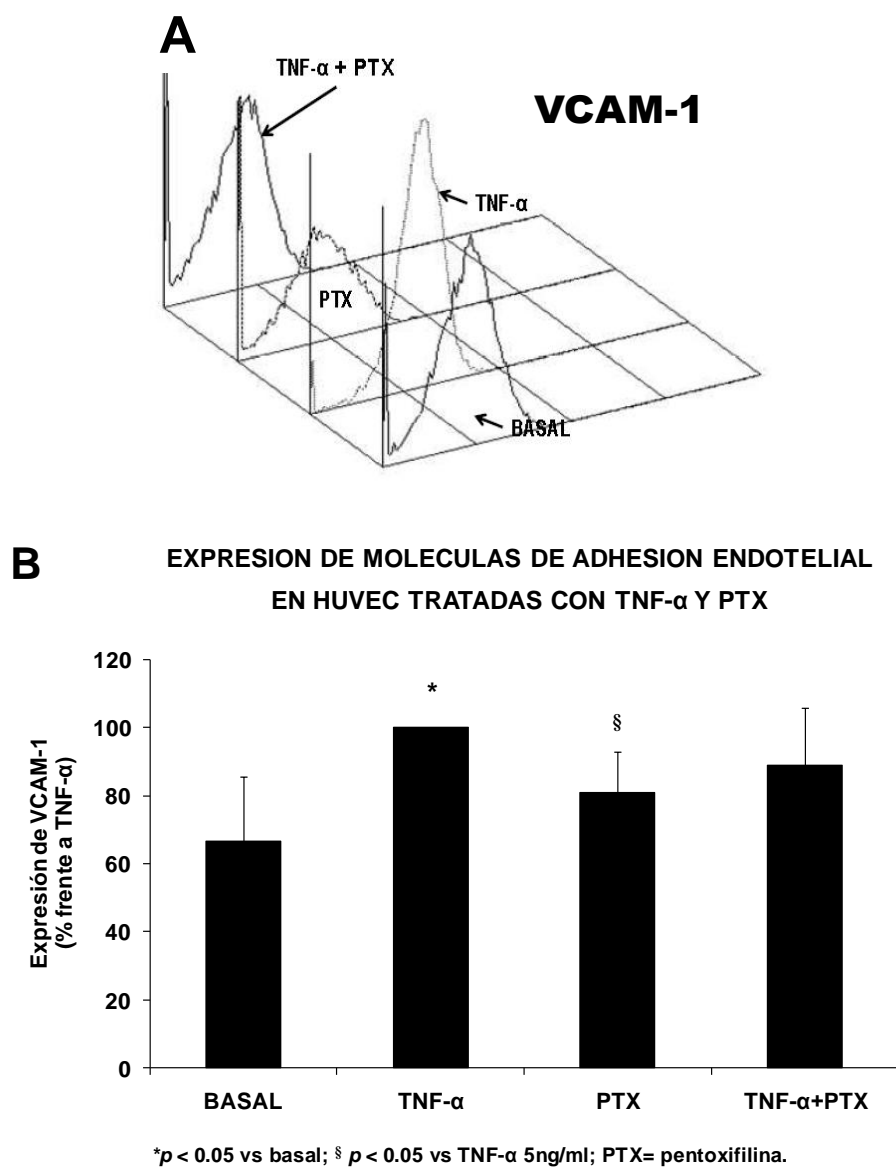


Figura 38. Expresión de VCAM-1 en HUVEC estimuladas con TNF- α (5 ng/ml) y tratadas con PTX (1 mg/ml).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Diversos estudios de en diferentes poblaciones, han mostrado que la prevalencia de la ECV de pacientes con IRCT en diálisis es muy elevada y la mortalidad por esta causa es 10-30 veces superior a la población general¹³. Además, numerosas evidencias sustentan que entre los factores de riesgo CV emergentes, la microinflamación vascular sistémica es un determinante principal tanto del inicio y progresión, como de los resultados clínicos de la ECV³²⁻³⁵. Por lo tanto, diversos marcadores de inflamación (p.ej. PCR^{23,181}, TNF¹⁹⁷, entre otros) tienen una potencial aplicación clínica como predictores de mortalidad total y CV, y como consecuencia se han convertido en posibles dianas terapéuticas¹⁸⁵.

Recientemente nuestro grupo ha demostrado por primera vez en un estudio a mediano plazo (seguimiento de 4 meses) que existe una posible estrategia para tratar de forma eficiente, eficaz y con el mínimo de efectos adversos, la inflamación vascular sistémica en los pacientes con IRCT en diálisis. En un ensayo clínico controlado, doble ciego y aleatorizado, la PTX vs placebo disminuyó significativamente la cascada inflamatoria, determinada por los niveles séricos de TNF- α , IL-6 y PCR, en pacientes con IRCT en HD procedentes de una población seleccionada de México²⁶². Estos hallazgos dieron lugar a desarrollar el presente estudio donde se demostró, por un lado, de forma más específica el efecto de la PTX como anti-inflamatorio sistémico, y por otro lado como modulador de marcadores de DE en pacientes con IRCT con DP y HD vs controles sanos sin tratamiento procedentes de una población seleccionada de España (Madrid).

Una de las principales fortalezas del presente estudio es la replicación de los resultados obtenidos en el ensayo previo realizado en México, al observar una disminución de las concentraciones séricas de citoquinas proinflamatorias en dos poblaciones demográficamente distintas y con el mismo proceso patológico que nos compete. Asimismo, otra de nuestras metas logradas fue demostrar la eficacia de la PTX en pacientes tanto en

DP como en HD, a la dosis mínima oral tanto en el ensayo clínico (400mg durante la noche) como *in vitro* [1 mg/mL, concentración más cercana a las concentraciones plasmáticas (rangos de 100-900 ng/mL) de PTX en ensayos con dosis única oral de 400 mg en voluntarios sanos²⁷⁴].

I. PARTE CLÍNICA

Aspectos demográficos basales, y clínico-bioquímicos de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.

Las variables de confusión (tales como edad¹³³⁻¹³⁷, sexo²⁷⁵, peso²⁷⁶, tiempo en diálisis, dosis de diálisis y dosis de rHuEPO^{1,4,5}) fueron similares en ambos grupos de diálisis por lo que no influyeron en el resultado final de nuestro estudio.

En relación a las causas de IRCT, cerca de tres quintas partes de los pacientes fueron debidas a GNC, ERPQ e HTA y en una menor proporción fue debido a DM tipo 2. La prevalencia de nefropatía vascular en el presente estudio fue también similar a lo reportado en otros estudios españoles⁵ y de Francia²⁷⁷. Los presentes resultados están de acuerdo con los informados por *López Revuelta K y colaboradores*²⁷⁸ de que la etiología de la IRCT en Europa es diferente de la de EUA, donde la DM y la HTA son >70% de los casos, comparado con <50% en Europa.

Ambos grupos de diálisis tuvieron cifras de TAS y TAD mayores antes y después de la intervención farmacológica que los controles sanos. Hallazgos coincidentes con estudios previamente publicados realizados en España y Europa^{5,279}. La HTA está presente en muchos pacientes con IRCT y es una de las principales causas de progresión del daño renal y la IRCT²⁸⁰. Se desconoce el posible mecanismo por el cual la PTX disminuyó las cifras de

TA al final del seguimiento en ambos grupos de diálisis; sin embargo, esta tendencia ya ha sido referida por *Renke M y colaboradores*²⁸¹ al evaluar el efecto de la PTX (1200 mg/día oral) sobre la proteinuria, los marcadores de daño tubular y el estrés oxidativo en 22 pacientes no diabéticos con IRCT, durante un seguimiento de 8 semanas.

El peso seco en ambos grupos de diálisis tendió a incrementarse al final del estudio, siendo sólo estadísticamente diferente en el grupo de DP. Es bien reconocido que la sobrehidratación ha sido asociada con la génesis de la inflamación sistémica¹⁹⁰. Sin embargo en este sentido no pudo ser atribuido a un mal control de líquidos en el grupo de DP ya que por un lado no se dispuso en el presente estudio de evaluación de la composición corporal puesto que no fue uno de nuestros objetivos y segundo tampoco pareció influir en la inflamación, de hecho el grupo de sujetos en HD mostró mayor inflamación que el grupo de DP al inicio del estudio y ambos grupos respondieron favorablemente al efecto anti-inflamatorio de la PTX. Además, la disminución de la TA post-PTX podría sugerir un mejor control hídrico, y posiblemente un mejor estado inflamatorio asociado a este aspecto.

Según las Guías de la “*National kidney Foundation (K/DOQI)*”²⁸² recomienda un Kt/V_{urea} para DPCA > 2.0/semana, para DPA (DPCC y DPIT) >2.1/semana y para HD igual o superior a 1,2/sesión. Por tanto, en ambos grupos de pacientes con diálisis del presente estudio, la dosis de diálisis fue recibida en valores aceptables durante todo el seguimiento^{5,282}, y por ende, una dosis subóptima de diálisis no pareció haberse asociado con la presencia de inflamación en este estudio ya que la función renal residual incluida en el Kt/V_{urea} total no fue diferente.

Aunque la HD es la técnica más utilizada en todo el mundo^{5,6,283}, decidimos evaluar también nuestros parámetros en los sujetos en DP por ser igualmente una técnica muy recurrida, y la más utilizada en países como México. Las causas de inflamación en los

pacientes en DP son múltiples e incluyen bioincompatibilidad de las soluciones convencionales de DP^{284,285}, la sobrecarga de líquido²⁸⁶ y una reducción de la función renal residual. En adición factores genéticos pueden estar implicados en la patogénesis de inflamación influenciando la expresión y producción tanto de mediadores anti-inflamatorios como pro-inflamatorios²⁸⁷. Por otro lado, el tipo de transporte peritoneal alto está implicado en la alta mortalidad de pacientes con DP^{288,289} y el incrementado estado inflamatorio presente en los pacientes con alta tasa de transporte peritoneal¹⁹⁰ puede explicar esta incrementada mortalidad; marcadores de inflamación tales como PCR e IL-6 han demostrado ser claramente predictores de una incrementada mortalidad en DP. La inflamación también podría influir en el desarrollo de aterosclerosis empeorando el pronóstico de los sujetos en DP¹⁸³.

En el grupo de DP más del 80% utilizó la técnica DPA, lo cual suele ser frecuente en España⁵, consideramos que esto no pudo influir en la magnitud del estatus inflamatorio entre ambos grupos ni en los resultados a partir de nuestra intervención farmacológica. Por un lado, como es reconocido, no existen diferencias importantes entre ambas técnicas. *Rabindranath KS, y colaboradores*²⁹⁰ han reportado que la DPA no ha mostrado significativas ventajas sobre la DPCA en términos de importantes resultados clínicos. *Vicente-Martínez M, y colaboradores*²⁹¹ refirieron que los pacientes en DP, tanto DPA como DPCA tienen incrementados fluidos extracelulares comparados con controles sanos, y como ya es reconocido la inflamación está relacionada con la hiperhidratación y con las altas tasas de transporte peritoneal. Por otro lado, en un estudio retrospectivo y comparativo de 3 años, en las técnicas de DPA y DPCA la frecuencia de mortalidad fue igualmente alta y las causas de defunción fueron insuficiencia cardíaca, sepsis, evento vascular cerebral e infarto al miocardio, con mayor predominio de la población diabética²⁹².

De los pacientes en HD incluidos, ~90% (14/15) tuvieron FAVI como acceso vascular permanente, con lo cual se controló la exposición a catéteres percutáneos, reconocidos por

asociarse con una mayor incidencia de infecciones e inflamación vascular sistémica²⁹³. Además, alrededor de dos terceras partes de sujetos en HD utilizaron el dializador FX80 Helixona, mientras que el resto utilizó el dializador HF80 Helixona; ambos dializadores son biocompatibles. *Kerr PG y colaboradores*²⁹⁴ demostraron en un ensayo clínico, doble ciego, randomizado y prospectivo (12 meses de seguimiento) en 60 pacientes en HD estables, que la diálisis a largo plazo, tanto con el dializador FX80 como con el HF80, no modificó ninguno de los parámetros de estrés oxidativo o inflamación; y aunque a la fecha no hay estudios previos entre la tasa de MoS en relación con los filtros de HD, podemos decir que todos los pacientes en HD incluidos en nuestro estudio, independientemente del dializador utilizado, tuvieron calidad del proceso dialítico y se minimizó la posibilidad de la inducción de moléculas proinflamatorias^{171,172,295}; descartando la posibilidad de que el tipo de dializador pudiera haber influido en los resultados finales de este estudio. Además el grupo de HD recibió 3 sesiones por semana, lo que es usualmente recomendado²⁸².

Aunque nuestros resultados muestran unas cifras de hemoglobina, hierro y ácido fólico inferiores en los sujetos en diálisis durante todo el estudio que los controles sanos, éstos se encontraron dentro de parámetros normales, a excepción del ácido fólico (en su inicio). También cabe mencionar que con la intervención farmacológica hubo una mejoría en estos tres parámetros, particularmente en el ácido fólico. *Martin Del Campo F, y colaboradores*²⁹⁶, demostraron que la baja ingestión de micronutrientes (incluyendo el ácido fólico) se asocia con malnutrición e inflamación en DP. Entonces, la mejoría del status inflamatorio sistémico observada en los pacientes en diálisis, pudo influir posiblemente en algún aumento de las concentraciones de este micronutriente, incluso hasta llegar a los parámetros normales, como se observó en ambos grupo de diálisis.

Algunas evidencias sugieren que las bajas concentraciones de c-HDL pueden empeorar el proceso aterosclerótico por promover la inflamación y la progresión de la lesión subclínica hacia eventos clínicos²⁹⁷. Si bien las concentraciones de c-HDL fueron

significativamente menores en ambos grupos de diálisis durante todo el seguimiento que las de los controles sanos, siempre estuvieron dentro de los parámetros recomendados y tendieron a mejorar en ambos grupos de diálisis con la intervención de PTX; no obstante, en general las concentraciones séricas de lípidos no se modificaron durante el estudio. *Prasad K y colaboradores*²⁹⁸ demostraron en conejos hembras de Nueva Zelanda, en cuatro grupos asignados (grupo I: controles; grupo II: control PTX; grupo III: 0.5% colesterol, y grupo IV: 0.5% colesterol + PTX) que la PTX redujo el desarrollo de ATE en un 38%, lo cual fue asociado con la disminución en suero del malondialdehído (MDA) un producto final de la peroxidación lipídica en un 32%, el MDA aórtico en un 37% y la reserva antioxidante en un 17.3% sin cambios en lípidos séricos. En este sentido la PTX pudo en parte reducir el desarrollo de la aterosclerosis hipercolesterolémica por la supresión de la producción y actividad de citoquinas más no por intervención sobre los lípidos.

La IL-6 es una citoquina cuya síntesis y secreción es inducida por TNF, y podría potencialmente mediar los efectos lipogénicos de este último a nivel hepático, al incrementar las concentraciones tisulares de citrato²⁹⁹. Lo anterior podría explicar en parte la hipertrigliceridemia de los pacientes en diálisis durante el estudio. También se pudo observar una tendencia a disminuir las concentraciones de triglicéridos como de colesterol total en ambos grupos de diálisis post-tratamiento, que aunque no fue un resultado significativo, podría haber estado asociado al efecto anti-inflamatorio de la PTX (efecto anti-TNF- α)³⁰⁰.

La albúmina ha sido tradicionalmente utilizada como uno de los marcadores para evaluar la malnutrición en los pacientes con IRCT; sin embargo, tiene una baja sensibilidad y especificidad, por lo que su nivel adquiere fortaleza al evaluarla conjuntamente con otros parámetros nutricionales³⁰¹. *De Mutsert R y colaboradores*³⁰² demostraron que al existir una asociación entre la albúmina sérica y mortalidad en pacientes en diálisis (1 g/dL de disminución de albúmina sérica puede asociarse con una incrementado riesgo de mortalidad

de 47% en HD y de un 38% en DP), esta es en parte explicada por la inflamación y no por la malnutrición. De hecho, la hipoalbuminemia (albúmina sérica ≤ 3.5 g/dL) es una condición común en pacientes con falla cardíaca y está relacionada con el síndrome complejo de malnutrición-inflamación; además, puede contribuir a la exacerbación del estrés oxidativo y de la inflamación^{196,303}, y a la generación de lipoproteínas asociadas a la ATE¹⁹⁸. Aunque en nuestro estudio las concentraciones de albúmina fueron menores al inicio en ambos grupos de diálisis vs sujetos sanos, al final del seguimiento se incrementaron significativamente en ambos grupos hasta alcanzar los parámetros normales (>3.5 g/dL); este cambio posiblemente fue promovido por la disminución de la inflamación inducido por la PTX (efecto anti-citoquinas). Entonces la determinación de proteínas séricas es todavía un factor principal en el diagnóstico de malnutrición, sin embargo, la visión de las proteínas séricas como marcador de malnutrición está cambiando, ahora su valor también se ve afectado por un proceso inflamatorio³⁰⁴. De todas las proteínas del suero, la prealbúmina tiene la vida media más corta (1-2 días), por lo que es más útil para la evaluación de la malnutrición proteica aguda así como para la monitorización del estado nutricional³⁰⁵. Al mismo tiempo se considera una proteína negativa de la fase aguda y siempre es necesario evaluarla en relación a la PCR³⁰⁶. Aunque es bien reconocido que la inflamación favorece la disminución significativa de las concentraciones séricas de albúmina y prealbúmina³⁰⁷, en el presente estudio, si bien la prealbúmina se mantuvo dentro de los valores recomendados a lo largo de todo seguimiento, la intervención con PTX pareció haber contribuido a su estabilidad. Por otro lado, durante todo el estudio se observaron bajas concentraciones séricas de transferrina en ambos grupos de diálisis, particularmente en el grupo de HD. Como sabemos las bajas concentraciones séricas de transferrina son frecuentemente observadas en pacientes en diálisis, quizá como una consecuencia de la inadecuada ingesta proteica y/o de la pérdida de proteínas³⁰⁸. La tasa de síntesis de proteínas séricas como la transferrina disminuye en respuesta a la inflamación, por lo que las concentraciones séricas varían inversamente con proteínas de fase aguda como la PCR. Al igual que la albúmina y la prealbúmina suelen comportarse como marcadores ambiguos³⁰⁹.

La relación entre calcio y fósforo plasmático se mantiene constante en condiciones normales, y es un factor importante de solubilidad de los iones de calcio. El producto calcio x fósforo, expresado en mg^2/dL^2 es aproximadamente 40; cuando este producto aumenta, disminuye la solubilidad de las sales de calcio, acelerando la calcificación intimal así como la transformación de las células de músculo liso vascular a células osteoclásticas, resultando en la calcificación medial²⁸². En el contexto de la etiología de la calcificación vascular, varios factores de riesgo han sido asociados con calcificación vascular, entre ellos el fibrinógeno incrementado, PCR e hipoalbuminemia³¹⁰. Nuestros grupos de estudio presentaron un producto Ca x P aumentado durante todo el seguimiento, representando un incrementado riesgo de calcificación vascular; si bien la mejoría del estado inflamatorio también pudo influir en la tendencia al decremento del producto Ca x P, este cambio no fue significativo.

Estado microinflamatorio de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.

Está claro que en la población general > 40 años es muy frecuente el tener al menos un factor de riesgo para ECV. Como resultado, el 80-90% de personas con eventos CV tienen al menos un factor de riesgo CV mayor (hiperlipidemia, HTA, tabaquismo actual, diabetes), pero el 70% de los individuos que no desarrollan eventos CV también tienen al menos un factor de riesgo. Esto indica que los predictores mayores de riesgo son muy sensibles pero muy poco específicos (30%)³¹¹.

La evaluación de la presencia subclínica de ATE permitiría centrar los esfuerzos terapéuticos en los pacientes que han desarrollado ATE. Algunos trabajos recientes indican que la ATE subclínica es un evento precoz en la IRCT en el que están incluidos tanto factores clásicos como no clásicos. La ATE es una respuesta inflamatoria. La cuantificación

en suero de diversas citoquinas y reactantes de fase aguda pueden ser predictivos de ECV clínica. Sin embargo, la única citoquina que está suficientemente validada, disponible comercialmente y es de uso clínico rutinario, es la PCR de alta sensibilidad.

Este estudio evaluó distintos y reconocidos marcadores no tradicionales de inflamación sistémica y de riesgo CV^{66,67}; Como marcadores proinflamatorios se estudiaron TNF- α , IL-6 y PCR y como anti-inflamatorios IL-10 y Fetuina A, en dos poblaciones de diálisis (DP y HD). Nuestros resultados indican que hay un estado inflamatorio en ambos grupos, puesto que se observaron niveles significativamente más altos de citoquinas proinflamatorias antes de la intervención farmacológica de estudio (PTX) en comparación con los controles sanos, lo cual representó una prevalencia ~60% en la población de sujetos en diálisis con algún grado de inflamación. Con respecto a la citoquina anti-inflamatoria IL-10, ésta se comportó en sentido inverso, hallazgos esperados en este tipo de sujetos^{163,164}.

Una de las ventajas principales de la medición de citoquinas es su mayor sensibilidad, no obstante esto les da cierta inespecificidad ya que también suelen elevarse en diversos procesos inflamatorios como las infecciones¹⁸⁹. Por lo tanto, el siguiente paso fue buscar un parámetro que midiera la microinflamación de forma más específica; este parámetro es la subpoblación de Mos CD16+, los cuales exhiben características de células activadas y senescentes que pueden secretar altos niveles de moléculas proinflamatorias (ICAM-1, iNOS, IL-1, IL-6, TNF- α , entre otras¹²²⁻¹²⁴). Estas células tienen alta afinidad endotelial y son capaces de explicar en parte la ATE subclínica de condiciones patógenas de trasfondo inflamatorio crónico¹¹⁸, como la IRCT sin y con diálisis^{205,207,208}. Además, se han asociado con altas tasas de eventos CV y mortalidad en estos sujetos²¹⁴. Nuestros resultados mostraron que ambas poblaciones de pacientes en diálisis estudiadas tuvieron mayores concentraciones de CD16+, entre 2 y 3 veces por arriba de lo observado en sujetos sanos. Interesantemente, al analizar la capacidad secretora de los CD16+ se encontró un elevada concentración de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α superando 2-4 veces

los valores encontrados en sujetos sanos. Estos hallazgos fortalecen y coinciden con los resultados de las concentraciones séricas de las citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6), demostrando que la población en diálisis desde el inicio del estudio presentó un mayor status microinflamatorio sistémico que los controles sanos, seguramente inducido por la IRCT y sus múltiples factores en una población con alto riesgo CV.

En resumen la medición del número de CD16+ y de su capacidad secretora tendría las siguientes ventajas y desventajas sobre la determinación sérica de citoquinas proinflamatorias en los sujetos con IRCT:

- La subpoblación de Mos CD16+ puede activar moléculas implicadas directamente en la ATE subclínica, por un lado al representar el tipo celular de sangre periférica con mayor capacidad productora de citoquinas proinflamatorias^{122,124} y por otro lado por su alta afinidad endotelial^{128,129}, y aunque tanto los CD16+ como las citoquinas son reconocidos predictores de riesgo CV por diversos trabajos previamente publicados, podría sugerirse que tanto la tasa como la actividad de los CD16+ representaría el marcador proinflamatorio de los sujetos en diálisis que ofrece mayor especificidad en comparación a las concentraciones séricas de citoquinas proinflamatorias.
- Los CD16+ ni su actividad son afectados por la función renal residual, contrario a las concentraciones séricas de las citoquinas proinflamatorias¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.
- Los CD16+ son afectados por la terapia dialítica durante solo pocas horas (4 horas) postdiálisis²¹⁰.
- Además, de ser un marcador específico, *Merino A y colaboradores*²⁰⁶ evidenciaron que los CD16+ también representan un marcador más sensible que las citoquinas en sangre periférica al incrementarse primero en los sujetos con IRCT prediálisis.

- No obstante, establecer la determinación rutinaria de los CD16+ en los sujetos urémicos como marcador de microinflamación en la práctica clínica implica un coste elevado.
- Faltan estudios comparativos entre los CD16+ y los niveles de citoquinas proinflamatorias en los sujetos con IRCT para validar a esta subpoblación como marcador proinflamatorio.

La PTX, 3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)-3,7-dihidropurina-2,6-diona, es comúnmente utilizada como un vasodilatador y hemorreológico (que activa la microcirculación por aumento de la capacidad de deformación eritrocítica, inhibición de la agregación eritrocítica y plaquetaria y reducción de la fibrina aumentada patológicamente), el cual disminuye la resistencia de vasos y aumenta el flujo de la sangre en tejidos isquémicos. La PTX también mejora la flexibilidad de los eritrocitos, lo cual reduce la viscosidad de la sangre, la concentración plasmática de fibrinógeno, la agregación plaquetaria y la formación de trombos^{312,313}. Desde 1980, la PTX ha sido prescrita para el tratamiento de disfunciones sintomáticas vasculares, tales como enfermedad oclusiva, claudicación intermitente, úlceras venosas, isquemia cerebral y demencia vascular^{314,315}. La PTX es un inhibidor no específico de la PDE, disminuye la hidrólisis tanto del AMPc como del GMPc, y aumenta la señal de transducción dependiente del nucleótido cíclico^{316,317}. Los mecanismos exactos del efecto anti-inflamatorio de PTX no son completamente reconocidos hasta la fecha. Ha sido postulado que la disminución de la síntesis de TNF resulta de la elevación de AMPc, la activación de PKA y la declinación de calcio citosólico³¹⁸. Por otro lado, la PTX puede atenuar el estrés oxidativo por inducción de la superóxido dismutasa (MnSOD)³¹⁹ y barrido directo de radicales libres³²⁰. En el presente estudio la PTX demostró una disminución de citoquinas proinflamatorias tanto en sangre periférica como en células mononucleares CD16+ de pacientes con IRCT en diálisis. El posible mecanismo que puede explicar este efecto es que la PTX inhibe la actividad del NF- κ B^{321,322} acción crucial en la disminución de las citoquinas proinflamatorias, y disminuye la síntesis de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α ^{248,251} a nivel

transcripcional, en células mononucleares de sangre periférica *in vivo* e *in vitro*²⁵¹ a través de la inhibición de la iPDE.

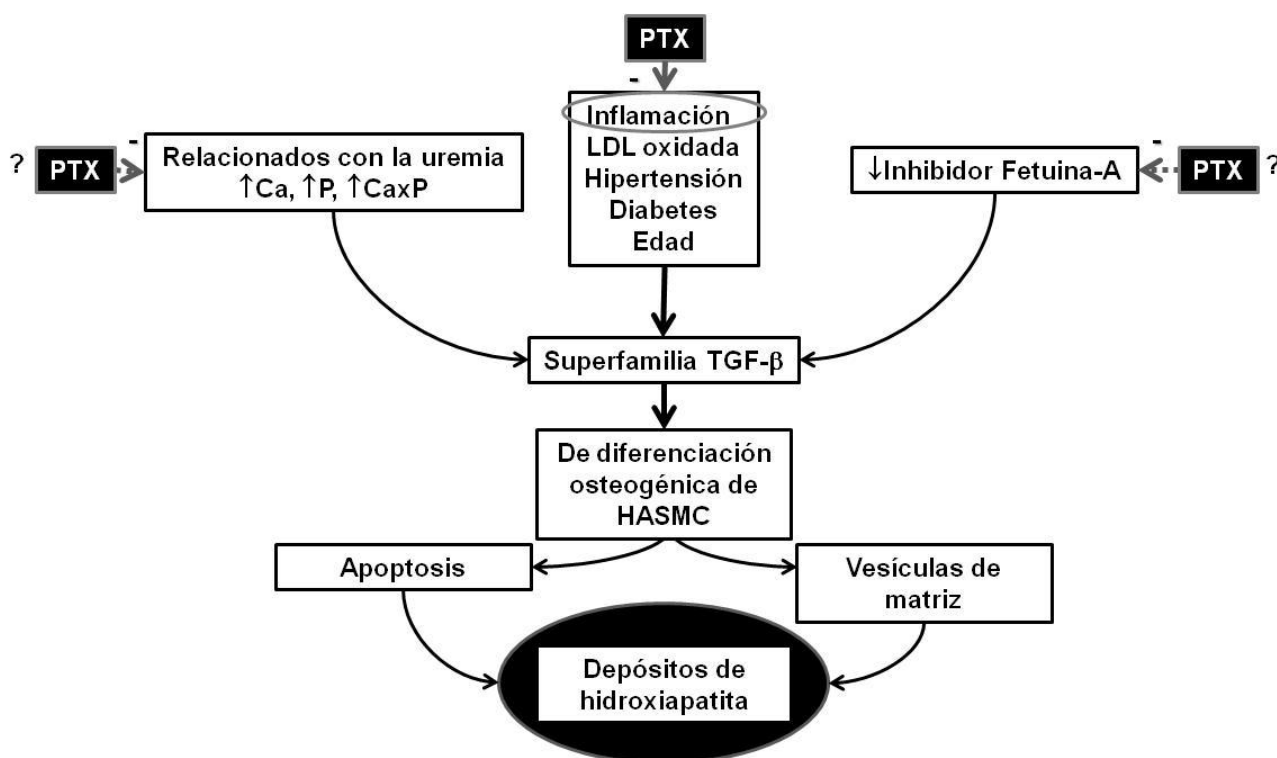
El TNF, es la mayor diana en los efectos anti-inflamatorios de la PTX³²³. Efecto producido por inhibición de la transcripción de su RNAm^{324,325}; La PTX es efectiva en todas las especies en que se ha probado, incluyendo humanos³²⁶, chimpancés^{327,328}, ratones³²⁹ y ratas³³⁰, así como en la secreción de la proteína de TNF en macrófagos y monocitos³³¹⁻³³⁵. El TNF- α activa una serie de vías de señalización, en particular proteinquinasa dependiente de AMPc (PKA), proteinquinasa C (PKC), 3-fosfatidilinositol cinasa (PI3-K) y protein cinasas activadas por mitógenos o MAP cinasas: p42/44 MAPK y p38 MAPK (MAPKs)^{336,337}. La estimulación de estas protein-cinasas en diferentes tipos celulares permite la activación de factores de transcripción tales como NF- κ B²³⁷. La PTX tiene efecto anti-TNF- α y anti-NF- κ B en células HASMC²⁴⁷ y anti-TNF- α en células HUVEC²⁵⁵. Su efecto anti-NF- κ B²⁴⁴, al parecer es por 2 vías de señalización intracelular reconocidas, la primera de ellas es a través de la activación de la cascada PKA, la cual a su vez suprime la vía MAPK raf-1/p42/44²⁴⁵ y la resultante activación del NF- κ B²⁴⁴. La segunda es la vía la PKC (independiente de PKA). La PTX reduce la fosfo-PKC inducida por TNF y los niveles de *fosfo-c-jun*, sugiriendo que puede modular también la actividad NF- κ B en una manera similar a la calfoestina C (inhibidor selectivo de PKC)²⁴⁷.

Se ha demostrado que la IL-6 es inducida por estimulación mecánica en las CML y que puede ser liberada en el espacio intercelular, donde ejerce su papel de iniciación de la respuesta inflamatoria *in vivo* e *in vitro* y que la vía de señal de transducción involucrada es *Ras/Rac1-p38 MAPK/NF- κ B/NF-IL-6*, la cual es negativamente regulada por PKC- δ . En el estrés biomecánico alterado persistentemente en los vasos, p. ej., en las zonas de ramificación de las arterias, la elevación local de IL-6 puede iniciar una respuesta inflamatoria y favorecer la formación de lesiones tempranas en la ATE³³⁸. Entonces, se podría sugerir que la PTX, quizá vía PKC- δ , inhibe a la IL-6 en sangre periférica.

En este mismo contexto el reactante de fase aguda y marcador reconocido en la práctica clínica, la PCR, participa directamente en la patogénesis de la ATE. La PCR es producida por células vasculares y órganos específicos, y aunque nosotros no realizamos su determinación en el sobrenadante de los Mos CD16+, Haider D, y colaboradores³³⁹, en un ensayo clínico controlado con placebo, doble ciego y aleatorizado en 6 voluntarios sanos que recibieron un bolo de endotoxina *E. coli* (LPS) o placebo, demostraron después de 6 horas que los PMN expresan y liberan constitutivamente PCR en sangre periférica mediante la generación de TLR4, NF- κ B y la PKC, y que su inducción no suele ser específica de LPS sino de citoquinas como IL-1, IL-6 y TNF- α . Además, la liberación de PCR de los PMN puede ser más relevante cuando el estímulo inflamatorio es más potente o mantenido sobre largo periodo de tiempo como sucede en el estado urémico por múltiples causas de estímulo constante³³⁹. Este hallazgo sugiere que la modulación negativa de la PCR por la PTX en el presente trabajo puede ser mediada posiblemente por la vía PKC, y en su mayor parte podrían estar implicados los CD16+.

El AMPc es un segundo mensajero bien conocido que opera a través de diferentes moléculas de señalización, incluyendo la PKA y las proteínas guanina de cambio directamente activadas por AMPc (EPAC). El AMPc estimula la producción de IL-10 a través de PKA en células B activadas, pero inhibe la IL-10 en Mos activados a través de EPAC. Es posible que el incremento de la IL-10 en sangre periférica que en el presente estudio tuvieron ambos grupos de diálisis después de la PTX pudiera ser dependiente de AMPc-PKA en células B activadas, más no por los CD16+ en cuyo sobrenadante no se detectaron niveles de IL-10. Interesantemente, la PCR y la expresión de su RNAm son suprimidos por la citoquina anti-inflamatoria IL-10³⁴⁰, lo que pudiera explicar en parte que el incremento de la IL-10 post-tratamiento con PTX de ambos grupos de diálisis pudo haber influido en las concentraciones séricas de PCR.

Por otro lado, un inhibidor sistémico importante de la calcificación ha sido identificado y recientemente llamado fetuina A o glicoproteína α^2 -Heremans-Schmid (AHSG). *In vitro*, la fetuina A ha mostrado ser un potente inhibidor de la formación de hidroxapatita y reductor de la formación de cristales en soluciones que contienen calcio y fosfato. Además, en los ratones knock-out de fetuina A, todos los tejidos se calcifican severamente³⁴¹. En humanos, los niveles de fetuina A fueron encontrados significativamente más bajos en pacientes en HD, tanto a corto como a largo tiempo de permanencia en diálisis comparado con los controles. Además, el suero de los pacientes en diálisis fue menos eficiente al inhibir la formación de cristales de fosfato cálcico que el suero normal, efecto que fue revertido por adición de la fetuina A³⁴². Asimismo, la fetuina A ha sido identificada como un predictor independiente de mortalidad cardiovascular y de todas las causas³⁴². Contemplando las características de la fetuina A, decidimos evaluar el efecto de la PTX sobre este inhibidor de la calcificación, y observamos que los pacientes en diálisis, aunque no tuvieron concentraciones diferentes a los controles sanos pretratamiento, si se incrementaron significativamente post-tratamiento. Con estos hallazgos se puede sugerir que la PTX puede influir favorablemente sobre algunos de los múltiples parámetros productores de la calcificación vascular habitualmente observada en esta población de pacientes (*Figura 39*); sin embargo, el posible mecanismo que explique justifique nuestro hallazgo aún es desconocido y requieren de más estudios.



Mecanismos patogénicos de la calcificación vascular y el posible efecto de la PTX. Ca x P, producto calcio-fósforo; TGF- β , factor transformante de crecimiento; HASMC, células de músculo liso vascular (Imagen tomada parcialmente de *IJKD* 2011; 5:285-299)

Figura 39. Posibles intervenciones de la PTX sobre los parámetros de calcificación vascular en pacientes con IRCT en diálisis

In vivo, los Mos son leucocitos primarios que interactúan con plaquetas activadas para formar agregados. Las plaquetas intactas inducen fuertemente la diferenciación monocítica. La interacción de moléculas de adhesión P-selectina y su ligando P-selectina glicoproteína 1 (PSGL-1) expresado en leucocitos, está involucrada en el contacto directo de los leucocitos circulantes con el endotelio y las plaquetas activadas. Las selectinas pueden regular el crecimiento celular más allá de mediar el rodamiento y adhesión de los leucocitos. La PKC consiste en un grupo de quinasas celulares serina/treonina que han sido implicadas en la regulación de la proliferación celular y diferenciación. Hay 11 isoformas de PKC identificadas. Entre ellas la PKC- δ han mostrado estar involucrada en la diferenciación mieloide y es activada por estimulación de M-CSF^{343,344}. La P-selectina tiene el posible papel en la generación de MØs y de Mos CD16+ y se sugiere el posible involucramiento de la

PKC- δ en la expansión de los CD16+, lo cual posiblemente tienen implicaciones clínicas en enfermedades con número incrementado de CD16+³⁴⁵. Por lo tanto, el posible efecto inhibidor de la expansión de los CD16+ en ambos grupos de diálisis por parte de la PTX pudiera ser mediado por la PKC.

Función endotelial de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.

Puesto que la microinflamación ha sido implicada en todos los estadios del desarrollo de la ATE³⁴, la atención de nuestro estudio también se centró en marcadores de DE que participan en las vías inflamatorias.

Las concentraciones plasmáticas de PAI-1 en ambos grupos de diálisis fueron significativamente mayores durante todo el seguimiento en comparación a los controles sanos, lo cual indica que los sujetos de estudio podrían presentar un estado crónico de activación del endotelio y con mayor precisión, mayor riesgo de aterotrombosis. Post-tratamiento con PTX, las concentraciones de PAI-1 disminuyeron significativamente, aunque sin lograr igualar a las de los controles sanos; lo anterior sugiere que el PAI-1 puede ser una posible diana terapéutica y marcador para monitorizar la actividad endotelial en estos sujetos de elevado riesgo³⁴⁶. *Cigolini M y colaboradores*³⁴⁷ demostraron que la PTX disminuyó la liberación de la proteína PAI-1 en el tejido adiposo humano *in vitro* por inhibición del TNF- α . Esta información apoya la posibilidad del notorio papel del TNF- α endógeno sobre las concentraciones plasmáticas incrementadas de PAI-1. *Tarhan OR y colaboradores*³⁴⁸ demostraron que la PTX reduce las adhesiones peritoneales e incrementa la fibrinólisis en ratas asociado a una disminución de las concentraciones de PAI-1 y a un aumento de las de t-PA.

Por otro lado, la TM es una glicoproteína transmembrana de las células endoteliales vasculares, sirve como un receptor para la trombina y juega un papel pivote en mantener la fluidez de la sangre³⁴⁹. El complejo trombina-TM incrementa la tasa de activación anticoagulante de la proteína C más de 1000 veces, lo cual, a su vez, inhibe fuertemente la coagulación sanguínea al degradar los factores V y VIII. Durante el daño vascular, la TM unida al endotelio puede ser fragmentada por varias proteasas y su porción extracelular es liberada a la sangre y/o permanece internalizada y degradada por las células endoteliales³⁵⁰. La TM soluble, la cual conserva propiedades anticoagulantes, es depurada de la circulación por los riñones y es probablemente degradada por el hígado. El papel fisiológico de la TM soluble es desconocido, pero ha sido considerada tradicionalmente como un marcador de daño endotelial vascular en una variedad de trastornos³⁵⁰. La activación y el daño endotelial se han demostrado en los pacientes con HD, y han sido asociados con defectos homeostáticos, ATE acelerada y mortalidad CV incrementada³⁵¹. En nuestro estudio observamos que las concentraciones séricas de TM soluble en los pacientes en diálisis antes de la intervención farmacológica (PTX) fueron significativamente menores que en los controles sanos, contrario a lo reportado en otras publicaciones donde las concentraciones de TM soluble han sido encontradas incrementadas, particularmente en los pacientes en HD. Esta elevación es parcialmente el resultado de la función excretora renal disminuida^{351,352}. No obstante, *Borawski J y colaboradores*³⁵³ demostraron que la TM soluble no se relaciona con la edad, sexo, tabaquismo, causa de falla renal, prevalencia de ECV, dosis de HD recibida o, preservación de la función renal, entre otras variables, sino que además de la activación endotelial, los elevados niveles de TM soluble de sujetos en HD pueden ser relacionados con infección viral y/o disfunción hepática, e influenciados por factores modificables tales como la TA, el tipo de heparina o la rHuEPO usada. Desconocemos el mecanismo por el cual las concentraciones de TM soluble se encontraron disminuidas en ambos grupos de diálisis al inicio del estudio, sin embargo, suponemos que los tipos de dializadores en los sujetos en HD pudieron influir en estos niveles. Recientemente, *Omichi M y colaboradores*³⁵⁴ demostraron que la TM soluble es absorbida

por la membrana del dializador (*polisulfona-polivinilpirrolidona*) y previene la coagulación durante las diálisis. Por otro lado, la expresión de TM también puede ser regulada a la baja por el efecto de ciertas citoquinas (endotoxinas, IL-1 y TNF- α), lo cual pudo influir en los resultados basales de ambos grupos de diálisis³⁵⁵. La PTX en el presente ensayo incrementó las concentraciones séricas de TM en ambos grupos de pacientes en diálisis al final del seguimiento. *Ohdama S y colaboradores*³⁵⁶ demostraron que la PTX aumenta la TM en células HUVEC en una manera dosis dependiente, debido a la síntesis de novo de la proteína TM. Estos datos sugieren que la PKA puede estar involucrada en los mecanismos celulares reguladores de la expresión de TM y la PTX puede proteger parcialmente contra el daño celular endotelial inducido por TNF y restaurar el estado de anticoagulación del endotelio.

La Lp(a) es una lipoproteína rica en esteres de colesterol y fosfolípidos, que se asemeja en su composición a la LDL. La Lp(a) es considerada un factor de riesgo para ATE, sus elevados niveles séricos se correlacionan con complicaciones aterotrombóticas³⁵⁷. En el presente estudio, las concentraciones séricas de Lp(a) fueron significativamente mayores en los pacientes en diálisis. Además las altas concentraciones séricas de Lp(a) y el bajo peso molecular del fenotipo de la apolipoproteína (a) han sido asociados con resultados clínicos adversos en los pacientes en diálisis^{358,359}. Una de las propiedades físicas distintivas de la Lp(a) es su gran tendencia a la agregación, especialmente a altas concentraciones (≥ 10 mg/mL)³⁶⁰. En el presente estudio la PTX produjo una disminución significativa de las concentraciones séricas de Lp(a) en los pacientes en HD, aunque no sucedió así en los pacientes en DP. El mecanismo por el cual la PTX ejerció este efecto no está claro. La PTX disminuye las concentraciones séricas de PAI-1^{347,348} vía inhibición de TNF- α , e incrementa las concentraciones séricas de plasminógeno mediado principalmente por uroquinasa y activador tisular del plasminógeno; entonces se puede hipotetizar que, debido a que una de las características más llamativas de la apo(a) es su homología estructural con el

plasminógeno (80% aproximadamente³⁶¹), al ser estimulado éste por la PTX, compete por los sitios activos en la fibrina, inhibiendo así la Lp(a), en pro de la fibrinólisis³⁶².

En el presente estudio también se observó que las concentraciones séricas de Hcy en los pacientes en diálisis fueron significativamente mayores que en los sujetos sanos antes de la intervención farmacológica (PTX). Las altas concentraciones séricas de Hcy en pacientes con IRCT son uno de los factores de riesgo para ECV. En un estudio efectuado en 176 pacientes con IRCT, aquellos con unas concentraciones séricas más altas de Hcy tuvieron una tasa de 2.9 veces más alta de ATE y eventos trombóticos^{263,364}. *Viann AC, y colaboradores*³⁶⁵ en un ensayo clínico controlado con placebo, doble ciego, y aleatorizado de 186 pacientes con IRCT, demostraron que el suplemento oral de ácido fólico durante dos años normalizó los niveles de Hcy, si bien no cambió la incidencia de eventos CV comparados con el grupo control. Entre nuestros hallazgos secundarios a la intervención farmacológica, pudimos observar que la PTX produjo una disminución significativa de las concentraciones séricas de Hcy en ambos grupos de diálisis, por lo anterior, creemos que el efecto anti-inflamatorio de la PTX logró incrementar las concentraciones séricas de un micronutriente como el ácido fólico lo cual pudo a su vez influir en los resultados finales de la Hcy.

Las interacciones célula a célula son críticas en cada fase de desarrollo de la placa aterosclerótica y las moléculas de adhesión celular son mediadores esenciales en este proceso, pues juegan un papel central en el reclutamiento de las células inflamatorias para el desarrollo del ateroma³⁶⁶. Después de la activación, las moléculas de adhesión celular se desprenden de la superficie de las células endoteliales y pueden ser medidas en plasma⁴⁵⁻⁴⁹. Las CAM por lo tanto representan biomarcadores que pueden reflejar la activación endotelial subyacente y la inflamación vascular⁶⁶. Muchos factores han mostrado alterar la expresión de las CAM, sin embargo, sus concentraciones séricas incrementadas han sido identificadas en personas con enfermedad aterosclerótica³⁶⁵, y son predictores significativos de futura

muerte de causa CV en pacientes con enfermedad arterial coronaria documentada³⁶⁷. Nuestro estudio demuestra que las concentraciones séricas de una de las CAM, la VCAM-1, en los pacientes en diálisis antes de la intervención farmacológica fueron significativamente mayores que las de los controles sanos. Las concentraciones de CAM están elevadas en personas con IRCT o con reducidas tasas de filtrado glomerular^{368,369}, y han sido reportadas como predictoras de muerte por todas las causas de mortalidad en pacientes con IRCT y HD³⁷⁰. Es posible que la regulación a la baja de la VCAM-1 sea mediada secundariamente por la supresión del TNF- α a través de la PTX³⁷¹.

Además, en nuestro estudio se observó un incremento significativo en las concentraciones séricas de MCP-1 en el suero de los pacientes en diálisis antes de la intervención farmacológica (PTX). La MCP-1, es una de las citoquinas involucradas en la patogénesis de la ATE¹²⁹. La MCP-1 es expresada por Mos, MØ, células de músculo liso y células endoteliales en placas ateroscleróticas³⁷². La MCP-1 se une al receptor 2 de la quimioquina CC (CCR2) y promueve la migración y acumulación de Mos, particularmente los CD16+ en la pared vascular³⁷³. En modelos animales, se ha observado que la progresión de ATE es más rápida cuando existe una expresión incrementada de MCP-1³⁷⁴ y ésta disminuye con la delección genética de MCP-1³⁷⁵. La MCP-1 convierte la placa aterosclerótica estable en inestable³⁷⁶ y sus elevadas concentraciones séricas han mostrado asociarse con el IAM³⁷⁷. Una asociación entre los incrementados niveles de MCP-1 con la extensión de ATE es parecida. Por lo tanto, la determinación sérica de MCP-1 puede ser utilizada como biomarcador del pronóstico de la ATE. En el presente estudio mostramos que la PTX es capaz de disminuir significativamente también las concentraciones séricas de MCP-1 en los pacientes en diálisis. *Lin SL, y colaboradores*³⁷⁸, reportaron que la PTX es un agente anti-inflamatorio efectivo e inmunomodulador capaz de suprimir los RNAm de ICAM-1 e MCP-1 en riñones nefríticos. *In vitro*, hay reportes que muestran que la PTX inhibe la

expresión de ICAM-1 en monocitos³⁷⁹ y regula a la baja la inducción de MCP-1 en células mononucleares de sangre periférica y en células tubulares proximales renales³⁷⁸.

Por otro lado, en nuestro estudio observamos la presencia de concentraciones elevadas de VEGF en los pacientes en diálisis en comparación a los sujetos sanos, sin ser significativamente diferentes antes de la intervención farmacológica (PTX). *Stompór T y colaboradores*³⁸⁰ han señalado que la inflamación sistémica en pacientes en DP se asocia con concentraciones plasmáticas altas de VEGF, y que a su vez, estas pueden asociarse con la función de la membrana peritoneal. Efectos deletéreos del VEGF han sido demostrados en la ATE y la sepsis las cuales son frecuentes complicaciones en los pacientes con falla renal³⁸¹. De tal forma que las concentraciones plasmáticas alteradas de factores de crecimiento como el VEGF en nuestro estudio, pueden reflejar un mal pronóstico de los pacientes en diálisis, como lo han demostrado otros estudios³⁸². En las concentraciones plasmáticas incrementadas de VEGF, podrían estar involucrados los neutrófilos humanos circulantes ya que se ha demostrado que contienen una proporción intracelular considerable de VEGF, en comparación con los linfocitos o Mos³⁸³. El VEGF es secretado en el espacio intracelular por la degranulación de los neutrófilos inducida por phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), fMet-Leu-Phe y TNF- α . *Gaudry M y colaboradores*³⁸⁴ han señalado que la PTX inhibe la degranulación de los neutrófilos por inhibición del TNF- α e induce la inhibición de la secreción de VEGF por PMA a dosis dependiente. Estos hallazgos podrían explicar en parte nuestros resultados post-tratamiento, pues la PTX disminuyó significativamente las concentraciones séricas de VEGF en ambos grupos de pacientes en diálisis en comparación a los sujetos sanos.

El TGF- β 1 es un factor de crecimiento pleiotrópico (múltiples efectos distintos) homodimérico de 25 kD, producido por una gran variedad de células, incluyendo M \emptyset , linfocitos, CML y plaquetas. Se sintetiza como un precursor inactivo que debe ser escindido proteolíticamente para generar la proteína activa³⁸⁵. En los últimos años, algunos resultados experimentales han sugerido que el TGF- β 1 puede tener un papel clave en la ATE por

inhibición de la migración y proliferación de células de músculo liso y MØs. En la mayoría de células epiteliales, TGF- β 1 es un inhibidor del crecimiento y tiene una fuerte acción anti-inflamatoria. Los ratones knock-out para TGF- β 1 tienen defectos en linfocitos T reguladores, lo que genera una inflamación extensa, con abundante proliferación de linfocitos T y diferenciación de CD14⁺^{386,387}. En el presente estudio, las concentraciones plasmáticas de TGF- β 1 antes de la intervención farmacológica (PTX) fueron significativamente menores en ambos grupos de diálisis en comparación a los sujetos sanos. Los niveles bajos de TGF- β 1 podrían estar hipotéticamente relacionados con daño endotelial subclínico ya que son un factor de riesgo para ATE en pacientes con IRCT³⁸⁸. Al final del seguimiento, la PTX tendió a incrementar las concentraciones plasmáticas de TGF- β 1 en ambos grupos de diálisis. Aunque el posible mecanismo por el cual ejerce este cambio pudiera explicarse vía AMPc-PKA³⁸⁹, del anterior resultado se entiende que el efecto de TGF- β 1 sobre MØ y Mos es predominantemente supresor, pudiendo inhibir la proliferación de estas células. No obstante, también puede tener un efecto opuesto, es decir, TGF- β 1 afecta a bajos niveles a MØ y Mos de un modo quimiotáctico, viéndose incrementada la expresión de citoquinas monocíticas^{390,391}.

El PDGF juega un papel importante en la proliferación y migración celular, y la angiogénesis. PDGF también ha sido relacionado con varias enfermedades como la ATE, la fibrosis y las enfermedades malignas³⁹². Por lo tanto es uno de los numerosos factores que regula el crecimiento y división celular. Es producido por una gran cantidad de células, incluyendo las CML, MØ activados y células endoteliales³⁹³. Nosotros observamos que las concentraciones plasmáticas de PDGF en ambos grupos de diálisis pre-tratamiento fueron significativamente mayores que en los controles sanos, pero al final del seguimiento estas concentraciones plasmáticas disminuyeron significativamente. Aunque desconocemos el mecanismo exacto por el cual PTX ejerció dicho efecto, varios estudios han demostraron que la PTX inhibe la proliferación estimulada de PDGF de CML por supresión de la

activación de la vía Akt/NF- κ B³⁹⁴. PTX es un potente inhibidor de la proliferación celular, y su mecanismo subyacente *in vivo* e *in vitro* se explica porque la PTX causa detención de G1 por reducción de la expresión de ciclina D1. Tras aumentar los niveles de AMPc y a través de PKA, interfiere en la señalización de PDGF y en la activación de Akt³⁹⁵.

Cambios en la capacidad fibrinolítica (t-PA) y vasomotora (NO₃) en pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.

Al conocer que nuestra población de sujetos en diálisis estudiados presentó alteraciones de los marcadores proinflamatorios y de DE en sangre periférica se decidió escoger una muestra aleatoria de 24 sujetos en diálisis para analizar de forma más específica la capacidad fibrinolítica y de relajación endotelial antes y después de una prueba de VO, así como antes y después del tratamiento con PTX vs sujetos sanos sin tratamiento. Para facilitar la interpretación de estos resultados se optó por hacer la razón aritmética post-VO/pre-VO, tanto antes como después de la PTX.

En primer lugar las concentraciones plasmáticas disminuidas de uno de los factores antitrombóticos determinado (Razón VO de t-PA) antes de la intervención farmacológica (PTX) refleja un estado de hipofibrinólisis con riesgo de trombosis o embolismo en ambos grupos de diálisis vs controles sanos. El t-PA es una proteína proteolítica implicada en la disolución de coágulos de sangre y es secretada por el endotelio vascular después de sufrir una lesión; Su función como enzima es catalizar la conversión del plasminógeno en plasmina, que es la enzima principal para la disolución de los coágulos de sangre³⁸⁵. La PTX mejoró la respuesta a la isquemia, tras incrementar las concentraciones plasmáticas de t-PA post-VO vs pre-VO, aumentando la fibrinólisis. Resultado posiblemente dependiente de la inhibición comprobada en el presente estudio de las concentraciones plasmáticas del PAI-1 por efecto anti-TNF- α de la PTX^{347,348}.

Los **nitritos (NO_2) y los nitratos (NO_3)** son productos finales del NO, utilizados en la práctica clínica para evaluar la síntesis de NO³⁹⁶. Se ha demostrado que las concentraciones séricas NO_2/NO_3 (NO_x) están significativamente incrementadas en pacientes sépticos, comparados con controles, y estos niveles se correlacionaron positivamente con el $\text{TNF-}\alpha$ ³⁹⁷. En otro estudio se demostró que las concentraciones séricas incrementadas NO_x pueden indicar, por un lado inestabilidad futura de la placa aterosclerótica en pacientes con angina de pecho crónica estable, y por otro lado pueden identificar a largo plazo a los pacientes con riesgo de muerte o recurrencia de eventos coronarios agudos después del IAM³⁹⁸.

Nosotros determinamos las concentraciones plasmáticas de los NO_3 , las cuales fueron significativamente menores en pacientes con diálisis antes de la prueba de VO y de la intervención farmacológica en comparación con los controles sanos, lo que sugiere posiblemente un incremento en el riesgo CV y una disminuida capacidad de relajación del endotelio en respuesta a la isquemia. El NO es un potente vasodilatador, sintetizado por células endoteliales para inhibir la adhesión y agregación plaquetaria, la liberación de factores mitógenos y proliferación de CML⁶⁸. Varias publicaciones han asociado la ATE temprana con la producción baja de NO. El déficit de NO estimula la entrada de los MØs en los vasos sanguíneos³⁹⁹. *Aguilera A y colaboradores*⁴⁰⁰ demostraron una disminución significativa de las concentraciones séricas de NO_3 en pacientes con DP e hipoalbuminemia, señalando que la relación entre malnutrición-inflamación puede contribuir a la DE.

Nuestros resultados mostraron que la PTX incrementó significativamente la Razón post-VO/pre-VO de las concentraciones plasmáticas de NO_3 en ambos grupos de diálisis, sugiriendo una mejor capacidad vasodilatadora del endotelio en respuesta a la isquemia después del tratamiento con PTX. Aunque existen escasos estudios que hablan de este efecto de la PTX, recientemente *Nandi J y colaboradores*⁴⁰¹ demostraron *in vivo* en ratas con enfermedad inflamatoria intestinal, que el tratamiento con PTX reduce significativamente las

concentraciones séricas de TNF- α , NOx y la expresión de iNOS. Lo anterior sugiere que la inhibición de NOx y de iNOS puede ser secundaria a la inhibición de TNF- α por la PTX. Por otro lado *Motawi TK y colaboradores*⁴⁰² en un estudio *in vivo* en ratas, mostraron el potencial cardioprotector de la PTX, tras normalizar los niveles cardiacos de NOx y de HO-1, así como de disminuir las concentraciones séricas de TNF- α , lactato deshidrogenasa, creatincinasa (CK) y mieloperoxidasa (MPO) cardiaca.

Correlaciones entre variables clínicas de pacientes con IRCT en diálisis antes y después del tratamiento con PTX.

Antes y después de la intervención farmacológica en nuestro estudio se observó una correlación positiva entre CD16+ y Mos Totales. Los CD16+ son una subpoblación de Mos y es comprensible que al incrementarse dicha subpoblación a su vez se pudiera haber incrementado paralelamente junto el conteo total de Mos. Pero también, este hallazgo sugiere la mayor activación de los Mos en sujetos en diálisis.

Antes de la intervención farmacológica también se observó una correlación negativa entre las concentraciones séricas de TNF- α y albúmina. Como ya es reconocido las altas concentraciones séricas de TNF- α son asociadas con anorexia, con un pobre estado nutricional y con hipoalbuminemia en este tipo de pacientes^{403,404}. La malnutrición y la inflamación están asociadas con la IRCT. La inflamación reduce la síntesis de albúmina, transferrina y otras proteínas negativas de fase aguda y aumenta las tasas del catabolismo. De tal manera que en esta población de sujetos, frecuentemente se observa que la disminución de parámetros nutricionales se relaciona con el grado de inflamación y en su conjunto suelen predecir la enfermedad CV. Por tanto es explicable encontrar correlaciones negativas entre células o proteínas proinflamatorias como son los CD16+, los Mos totales o la IL-6 con marcadores del estado nutricional como lo son la prealbúmina o la albúmina, lo

cual a su vez predice la muerte por enfermedad CV en sujetos en diálisis así como la progresión del daño vascular⁴⁰⁵.

Después de la intervención farmacológica se observó una correlación positiva entre IL-6 y TNF- α , ambas citoquinas en sobrenadante de CD16+. Los Mos CD16+ han mostrado una mayor capacidad para producir tanto IL-6 como TNF- α intracelular con respecto a las células convencionales CD14+. De hecho TNF- α e IL-6 son detectados en sobrenadante cultivos de estas células; es esperable detectar niveles paralelos en los Mos^{406,407}. También se encontró una correlación negativa entre IL-10 y triglicéridos. *Mizia-Stec K y colaboradores*⁴⁰⁸ evaluaron la influencia de la hiperlipidemia sobre las concentraciones séricas de ciertas citoquinas como TNF α , sTNFR, IL-10 en 94 sujetos con enfermedad arterial coronaria estables. En este estudio, la activación inmune de los pacientes con enfermedad arterial coronaria estuvo relacionada con los niveles de lípidos séricos.

II. PARTE *IN VITRO*

Expresión de la proteína MyD88 en células HUVEC tratadas o no con el sobrenadante de Mos CD16+ de pacientes con IRCT en diálisis, antes y después del tratamiento con PTX y de controles.

Nosotros evaluamos el efecto de la PTX sobre uno de los inductores de la activación del NF- κ B, el MyD88. Al cultivar células HUVEC con sobrenadante de CD16+ de pacientes con IRCT en diálisis antes del tratamiento (PTX) se incrementa la expresión de MyD88. Por el contrario, hubo una disminución significativa de la expresión de esta proteína en las HUVEC sin tratar y en las tratadas tanto con sobrenadante de CD16+ de sujetos sanos y de sujetos en diálisis antes de al PTX con un inhibidor reconocido de NF- κ B (Tak-1). Después de la intervención farmacológica con PTX, hubo una disminución significativa de la expresión de MyD88 en las HUVEC tratadas con el sobrenadante de CD16+ de sujetos en diálisis

Una metodología similar para reproducir el efecto del estado urémico sobre las células endoteliales cultivadas (ECs) fue utilizada por *Aznar Salatti J y colaboradores*⁴⁰⁹ quienes demostraron que la exposición a suero urémico resultó en cambios cualitativos y cuantitativos en el endotelio vascular, caracterizados por una red intrincada de menos fibrillas, una morfología celular, de forma irregular y tamaño heterogéneo, con abundante presencia de vacuolas y un gran número de células mitóticas⁴⁰⁹ y aumento de la trombogenicidad de la matriz extracelular⁴¹⁰. Los cambios más importantes se relacionaron a inflamación y estrés oxidativo⁴¹¹. Las ECs son capaces de expresar moléculas que conectan a la vía de señalización del NF- κ B⁴¹².

El NF- κ B es ubicuo en las reacciones inflamatorias y ejerce su acción induciendo la expresión de citoquinas, quimioquinas y CAM⁴¹³. La expresión de las CAM-1 sobre las ECs

representa uno de los cambios patológicos más tempranos en las enfermedades inmunes e inflamatorias, tales como la ATE. El NF- κ B desempeña un papel clave desde las fases iniciales de la ATE hasta el desarrollo de los episodios vasculares³⁶⁶. La modulación de la activación de NF- κ B ofrece nuevas vías de abordaje para interferir con la fisiopatología de la ATE. No obstante, el papel clave de NF- κ B en procesos como el sistema inmunológico y la proliferación celular sugiere que una inhibición prolongada no selectiva de NF- κ B no es deseable.

Como lo indican diversos estudios experimentales preliminares en ATE sugieren que es posible obtener resultados beneficiosos mediante una acción directa sobre la regulación de NF- κ B. Por ejemplo, el uso de oligonucleótidos antisentido de la subunidad *p65* de NF- κ B se ha asociado con una atenuación de la celularidad neointimal en un modelo de daño carotídeo⁴¹⁴. Asimismo, se han empleado diversas moléculas con acción antioxidante *in vivo* que ya habían demostrado inhibición de la actividad NF- κ B *in vitro*. Por ejemplo, el pirrolidinditiocarbamato (PDTC) y la acetilcisteína son capaces de atenuar *in vivo* la activación de NF- κ B y reducir el daño en varios modelos inflamatorios experimentales⁴¹⁵. En fecha reciente se ha demostrado que la acción de múltiples fármacos inmunosupresores (esteroides, leflunomida, ciclosporina) se realiza al menos parcialmente por interacción con el NF- κ B⁴¹⁶. Los esteroides, por ejemplo, presentan una acción anti-NF- κ B por la concurrencia de diversos mecanismos: inhiben la degradación de I κ B por el proteasoma, interactúan físicamente con NF- κ B activado evitando su unión al ADN y promueven la expresión de I κ B⁴¹⁶. Sin embargo, los efectos secundarios de los inmunosupresores no permiten su uso indiscriminado para el tratamiento de la ATE. También en fecha reciente, se ha demostrado que algunos anti-inflamatorios clásicos, como los salicilatos, inhiben la fosforilación y degradación de I κ B, evitando la activación de NF- κ B⁴¹⁷. Hallazgos recientes demuestran que ciertos efectos benéficos de los inhibidores de la enzima convertidora de Ang (IECA) pueden relacionarse con la inhibición del sistema NF- κ B pues la Ang II estimula la activación de NF- κ B. Los IECAs han demostrado *in vivo* su capacidad de inhibir la

activación de NF- κ B y de genes pro-inflamatorios, así como el desarrollo de lesiones vasculares en un modelo de ATE en el conejo⁴¹⁸. No obstante, recientemente se demostró en un ensayo clínico controlado con placebo, doble ciego y al azar, que enalapril no disminuyó las concentraciones séricas de IL-6 ni de PCR en pacientes con HD²³³, por lo que los resultados en este sentido aún son controvertidos. La relevancia de estos hallazgos experimentales en la ATE en humanos requiere una evaluación adicional. Otro punto de interés reciente reside en el potencial efecto beneficioso de ciertos fármacos hipolipemiantes, independiente del descenso del colesterol circulante. *In vitro*, las estatinas pueden inhibir la expresión de genes proinflamatorios y la proliferación celular y promover la apoptosis de células musculares lisas de forma independiente de la disponibilidad de colesterol⁴¹⁹. Todas estas acciones se correlacionan con la inhibición del NF- κ B. Sin embargo, se desconoce que parte del efecto anti-inflamatorio puede ser atribuible al propio efecto hipolipemiante y que parte a otros mecanismos adicionales.

El MyD88 es una proteína adaptadora universal utilizada por todos los receptores de TLRs (excepto el TLR 3) para activar NF- κ B⁴²⁰. Algunos estudios recientes han demostrado que los posibles mecanismos mediadores de la inflamación de TLR4 pueden ser por dos vías: una conocida como vía dependiente de Myd88 y otra como vía independiente de Myd88. La activación de la vía dependiente de Myd88 resultará en la liberación primaria de citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-6 e IL-1. La vía independiente resultará en la liberación de IFN- β ⁴²¹. NF- κ B y MAPKs, dos efectores río abajo de MyD88 en esta vía sirven como factores transductores para mediar la expresión de VCAM-1 e ICAM-1⁴²². Por lo tanto, la obvia inhibición de MyD88 podrían tener aplicaciones clínicas en ECV. Esta es la razón por la que se seleccionó esta proteína como marcador indirecto de la activación de NF- κ B. De acuerdo con nuestros resultados, la PTX al mostrar un efecto inhibitorio de la expresión de MyD88 y posiblemente de la activación de NF- κ B como consecuencia, (producida por estímulo de sustancias proinflamatorias procedentes del sobrenadante de CD16+ de sujetos urémicos en diálisis) permite dilucidar su efecto beneficioso como

antiinflamatorio sistémico sugiriendo a su vez un interesante efecto protector del endotelio vascular ya que retrasaría la DE y por ende la ATE.

Efecto de la PTX sobre los niveles de NO₂ y expresión de iNOS en HASMC estimuladas con IL-1 β .

En el presente estudio se decidió evaluar *in vitro* el efecto de la PTX sobre algunos parámetros de la DE en HASMC en dos directrices. La primera línea consistió en evaluar el NO (mediante su isoforma inducible, iNOS), ya que como se sabe la NO es una molécula ateroprotectora de origen endotelial y su alteración favorece la perturbación de la homeostasis vascular (una de las manifestaciones más tempranas de la DE⁶⁸⁻⁷⁰). El anterior efecto está vinculado particularmente a su menor producción propiciando el desarrollo de lesiones ateroscleróticas⁷⁸. La segunda línea consistió en evaluar la expresión de nitritos como especies nitrosativas de oxígeno capaces de empeorar la función endotelial⁸¹.

Aunque los resultados mostraron que la PTX ejerció una relativa regulación a la baja tanto de los niveles de nitritos como de la expresión de iNOS a la dosis más baja (PTX 1 mg/ml, que correspondería a los niveles plasmáticos aproximados encontrados en pacientes renales con dosis de 400-600mg/día), en su mayoría no mostraron un patrón muy claro. Es posible que este resultado sea atribuido a la acción anti-TNF- α , ya que esta citoquina puede incrementar los niveles de nitritos y la expresión de iNOS al activar el NF- κ B⁸¹. Kim NY y colaboradores⁴²³ observaron que la PTX aumentó significativamente la producción de NO y la expresión de iNOS en HASMC estimuladas por IL-1 β . Estos efectos de la PTX fueron mediados predominantemente a través de la activación de NF- κ B vía PKA dependiente de AMPc.

Efecto de la PTX sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en HUVEC estimuladas con IL-1 β y TNF- α .

En su conjunto, hay una sólida evidencia de que el ICAM-1 juega un papel importante en las reacciones inmunológicas e inflamatorias. Por lo tanto, estrategias para disminuir o bloquear la expresión de ICAM-1 podría tener implicaciones terapéuticas. En este sentido, el bloqueo de ICAM-1 por anticuerpos específicos resulta beneficioso, p. ej. en ratas que sufren glomerulonefritis²⁵⁹ o en pacientes que sufren artritis reumatoide²⁶⁰.

Nuestros resultados demostraron que la PTX disminuyó las concentraciones *in vitro* de ICAM-1 y VCAM-1, inducidas por IL-1 β y TNF- α en células HUVEC. Aunque este cambio sólo fue significativo en el caso de ICAM-1, cuando se determinaron las concentraciones séricas de VCAM-1 en pacientes con diálisis, estas disminuyeron significativamente en comparación con sujetos sanos.

El TNF- α es un fuerte inductor de la expresión de ICAM-1, y de acuerdo a su efecto supresivo sobre la producción de TNF- α , la PTX ha mostrado inhibir la expresión de ICAM-1 inducida por TNF- α en cultivos de keratinocitos⁴²⁴. Además, la PTX puede influir en reacciones inmunológicas e inflamatorias inflamatorias. *Neuner P y colaboradores*⁴²⁵ demostraron que los efectos supresivos observados *in vivo* e *in vitro* de la PTX sobre el ICAM-1 en monocitos pueden contribuir a los efectos anti-inflamatorios descritos de la PTX, p. ej., en sepsis, dermatitis de contacto, etc. *Taha H, y colaboradores*⁴²⁶ han demostrado en un modelo animal de endotoxemia que la PTX reduce la expresión de VCAM en la intima vascular. Es posible que la regulación a la baja de las CAM sea mediada secundariamente por la supresión del TNF- α por parte de la PTX⁴²⁶.

A pesar de que los efectos de la PTX sobre HASMC no fueron concluyentes, PTX a través del presente estudio demuestra un evidente efecto antiinflamatorio en sangre

periférica (anti-citoquinas proinflamatorias y anti-CD16+) así como en endotelio vascular (a través de la modulación de marcadores de DE, anti-MyD88-NF-kB, y anti CAM-1) en sujetos con IRCT en diálisis e *in vitro*.

En la *Figura 40*, confluyen las posibles dianas de señalización intracelular donde la PTX puede ejercer su efecto anti-inflamatorio sistémico en sangre periférica como en las células vasculares endoteliales.

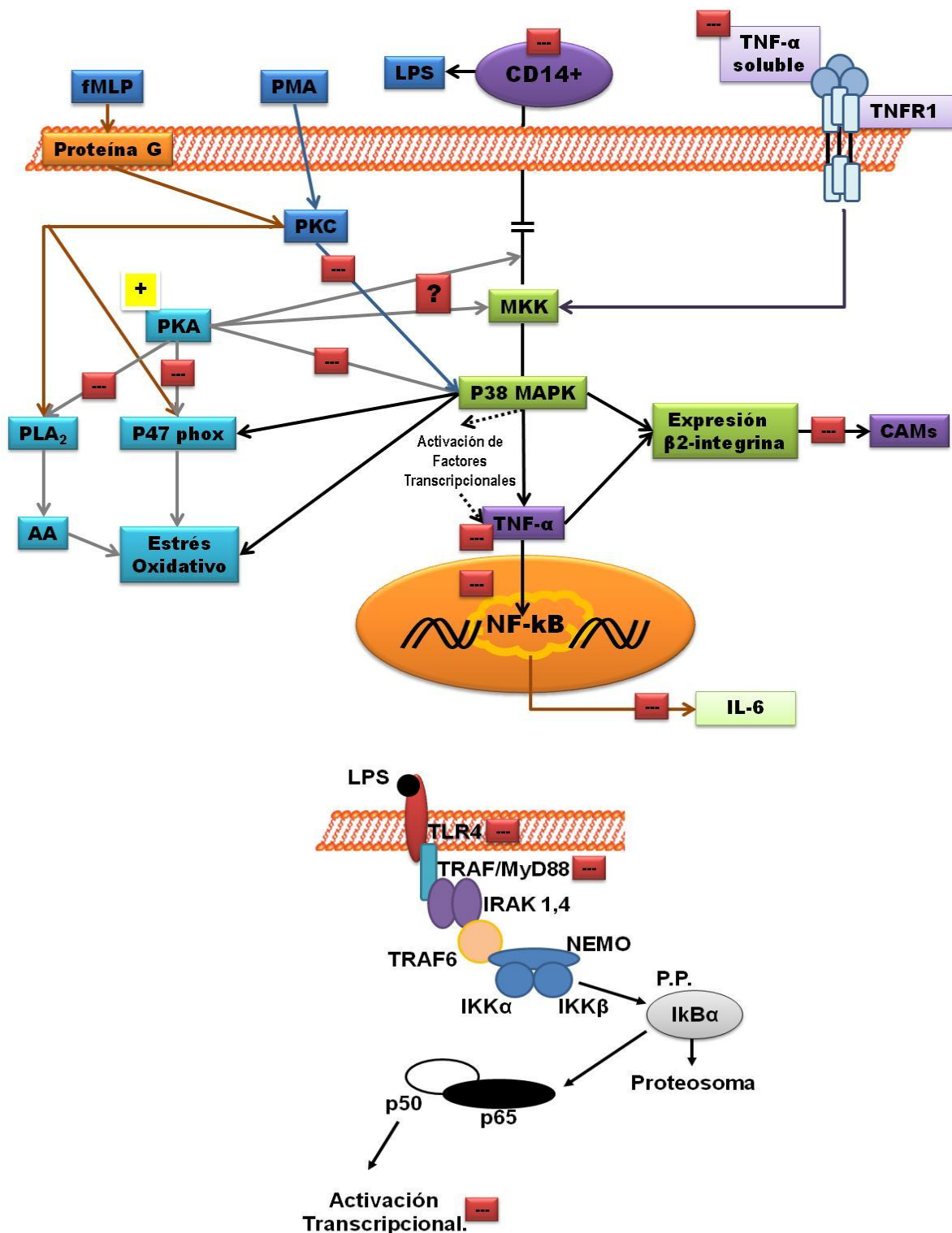


Figura 40. Posibles dianas de señalización intracelular de PTX en sangre periférica y en células vasculares. El signo "---" significa disminución o inhibición por la PTX, el signo "+" significa incremento de la actividad por la PTX y el signo "?" significa posibles efectos de la PTX pero aún desconocidos.

Una de las limitaciones del presente estudio es que aunque la evidencia epidemiológica relaciona la inflamación con un peor pronóstico en los pacientes con IRCT, y que la PTX logró disminuir diversos marcadores proinflamatorios y de DE, desde el punto de vista clínico como básico, este ensayo no demuestra una reducción del riesgo CV o de la mortalidad en estos pacientes. El diseño de este estudio no fue hecho para contestar la anterior pregunta, puesto que para ello hacerse un seguimiento prolongado. Por lo que se requieren más estudios para sustentar la hipótesis de que la PTX puede afectar de manera positiva, tanto la morbilidad como la mortalidad CV en esta población de pacientes. No obstante, los resultados obtenidos en el presente estudio sustentan su posible utilización en este sentido.

Por otro lado, si existe una causa obvia y tratable de inflamación es razonable tratarla (p.ej. infección). Sin embargo, a menudo no existe una causa evidente de microinflamación y se plantea la disyuntiva de si la determinación de marcadores de inflamación, en particular como la PCR (determinación de rutina intrahospitalaria), puede establecer las bases para un tratamiento anti-inflamatorio. Por los resultados obtenidos en este estudio, el tratamiento con PTX podría ser útil (siempre y cuando no haya contraindicaciones), aunque se requieren más estudios para lograr una evidencia suficiente que apoye su uso en pacientes inflamados.

CONCLUSIONES

“Las tres cosas más difíciles de esta vida: guardar un secreto, perdonar un agravio y aprovechar el tiempo.”

Benjamín Franklin (1706-1790). Científico y político estadounidense.

CONCLUSIONES

La PTX redujo progresiva y significativamente las concentraciones séricas de TNF- α , IL-6 y PCR, e incrementó las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y Fetuina A de pacientes con IRCT en diálisis tras un seguimiento de 4 meses vs sujetos sanos sin tratamiento.

En los pacientes con IRCT en diálisis se encontró un mayor porcentaje de Mos CD16+ (~17%) en sangre periférica comparado con controles sanos (~9%), el cual disminuyó progresiva y significativamente (~13%) después del tratamiento con PTX.

El tratamiento con PTX redujo de manera concordante la subpoblación de Mos CD16+ en sangre periférica y su capacidad secretora de citoquinas (IL-6 y TNF- α).

La PTX moduló las concentraciones plasmáticas de marcadores de DE [PAI-1, TM, Hcy, Lp(a), VCAM-1 MCP-1, VRGF, TGF- β 1 y PDGF] en sangre periférica de pacientes con IRCT en diálisis comparada con sujetos sanos sin tratamiento.

En la prueba de VO, la PTX ejerció un efecto fibrinolítico y vasodilatador al aumentar la razón (post-VO/pre-VO) de t-PA y NO₃ en sangre periférica de pacientes con IRCT en diálisis comparada con sujetos sanos sin tratamiento.

En los experimentos *in vitro*, la PTX redujo la expresión de la proteína MyD88 en células HUVEC tratadas con sobrenadante de Mos CD16+ de pacientes con IRCT en diálisis comparada con sujetos sanos sin tratamiento. Además PTX a la concentración de 1mg/ml tuvo un efecto anti-inflamatorio en las HUVEC, al disminuir la expresión de las moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1 y VCAM-1). Los resultados en HASMC no fueron concluyentes

respecto a la modificación de los niveles de NO₂ y de la expresión de iNOS. Estos hallazgos *in vitro* nos permiten deducir que el efecto anti-inflamatorio de la PTX a nivel vascular es predominantemente endotelial más que de músculo liso.

La PTX podría ser un fármaco eficaz y eficiente para tratar el estado microinflamatorio y la DE frecuentemente observado en pacientes en diálisis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

“Puede decirse que la diferencia más sobresaliente entre los hombres de ciencia y los demás profesionales es que los primeros aceptan su ignorancia y parten de ella para realizar sus trabajos y observaciones, mientras que los segundos basan sus actividades en los conocimientos que ya poseen o creen poseer.”

Ruy Pérez Tamayo (1924--). Médico investigador y académico mexicano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. USRDS. *Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, 2010
2. Just PM, De Charro FT, Tschosik EA, Noe LL, Bhattacharyya SK and Riella MC. Reimbursement and economic factors influencing dialysis modality choice around the world. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23(7):2365-2373
3. Sociedad Latinoamericana de Nefrología e Hipertensión. <http://www.slanh.org>
4. ERA-EDTA. <http://www.era-edta.org/>
5. Sociedad Española de Nefrología. <http://www.senefro.org>
6. Grassmann A, Gioberge S, Moeller S et al. ESRD patients in 2004: global overview of patient numbers, treatment modalities and associated trends. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(12):2587–2593
7. Sarnak MJ, Levey AS. Cardiovascular disease and chronic renal disease: A new paradigm. *Am J Kidney Dis* 2000; 35 (Supl):S117-S131
8. Culleton BF, Larson MG, Evans JC, Wilson PWF, Barrett BJ, et al. Prevalence and correlates of serum creatinine levels. The Framingham Heart Study. *Arch Intern Med* 1999; 159:1785-1790
9. Culleton BF, Larson MG, Wilson PWF, Evans JC, Parfrey PS, et al. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int* 1999; 56:2214-2219
10. Henry RMA, Kostense PJ, Bos G, Dekker JM, Nijpels G et al. Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: the Hoorn study. *Kidney Int* 2002; 62:1402-1407
11. Manjunath G, Tighiouart H, Coresh J, MacLeod B, Salem DN, et al. Level of kidney function as a risk factor for cardiovascular outcomes in the elderly. *Kidney Int* 2003; 63: 1121-1129
12. Shlipak MG, Fried LP, Stehman-Breen C, Siscovick D, Newman AB: Chronic renal insufficiency and cardiovascular events in the elderly: findings from the Cardiovascular Health Study. *Am J Geriatr Cardiol* 2004;13: 81-90
13. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL y cols. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease. A statement from the American Heart Association Councils on kidney in cardiovascular disease, high blood pressure research, clinical cardiology, and epidemiology and prevention. *Hypertension* 2003; 42:1050-1065

14. Rigatto C. Clinical epidemiology of cardiac disease in renal transplant recipients. *Semin Dial* 16: 106-110, 2003. Kasiske BL, Guijarro C, Massy Z, Wiederkehr MR, Ma JZ. Cardiovascular disease after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:158-65.
15. Tyralla K, Amann K: Morphology of the heart and arteries in renal failure. *Kidney Int* 2003; Suppl: 63 (Suppl 84):S80-S83
16. Amann K, Tyralla K, Gross ML, Eifert T, Adamczak M, Ritz E: Special characteristics of atherosclerosis in chronic renal failure. *Clin Nephrol* 2003; 60 (suppl 1):S13-21
17. Safar ME, London GM, Plante GE: Arterial stiffness and kidney function. *Hypertension* 2004; 43:163-168
18. London GM: Left ventricular alterations and end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 (Suppl 1):29-36
19. Locatelli F, Bommer J, London GM, Martín-Malo A, Wanner C, *et al.* Cardiovascular disease determinants in chronic renal failure: clinical approach and treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:459-468
20. Prichard S: Risk factors for coronary artery disease in patients with renal failure. *Am J Med Sci* 2003; 325:209-213
21. Longenecker JC, Coresh J, Powe NR, Levey AS, Fink NE, Martin A and Klag MJ. Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE Study. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:1918-1927
22. Muntner P, Hamm LL, Kusek JW, Chen J, Whelton PK, He J: The prevalence of non-traditional risk factors for coronary heart disease in patients with chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 2004; 140:9-17
23. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulter K, Diczfalussy U, Wang T, *et al.* Strong association between malnutrition, inflammation and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; 55(5):1899-1911
24. Sezer S, Ozdemir FN, Arat Z, Turan M, Haberal M. Triad of malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in hemodialysis patients. *Nephron* 2002; 91(3):456-462
25. Himmerlfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, and Hakim RM. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney int* 2002; 62:1524-1538
26. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Novel Cardiovascular Risk Factors in End-Stage Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 (Suppl 1):S77-S80
27. Foley R, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32 (Suppl):S112-S119
28. Methe H, Weis M: Atherogenesis and Inflammation was Virchow right? *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22:1823-1827
29. Zoccali C, Mallamaci F and Tripepi G. Traditional and emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2003; 85: Suppl:S105-S110. *Review*

30. Stenvinkel P: Endothelial dysfunction and inflammation is there a link? *Nephrol Dial Transpl* 2001; 16:1968-1971
31. Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH, Fuster V. Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens* 1992; 10:S43-50
32. Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM, Hirsch TA, Ikeda Y, *et al.* International prevalence, recognition and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. *JAMA* 2006; 295(2):180-189
33. Ross R. Atherosclerosis-An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126
34. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-874
35. Gonzalez MA, Selwyn AP. Endothelial Function, Inflammation and prognosis in Cardiovascular Disease. *Am J Med* 2003; 115:99S-106S
36. Dejana E. Cell adhesion in vascular biology. *J Clin Invest* 1996; 9:1949-1953
37. Nordestgaard B, Nielsen L. Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5:252-257
38. Pillarisetti S. Lipoprotein modulation of subendothelial heparan sulfate proteoglycans (Perlecan) and atherogenicity. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10:60-65
39. Gerszten RE, Mach F, Sauty A, Rosenzweig A and Luster AD. Chemokines, leukocytes and atherosclerosis. *J Lab Clin Med* 2000; 136:87-92
40. Herman MP, Sukhova GK, Kiseil W *et al.* Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107:1117–1126
41. Badimón L and Martínez-González J. Bases moleculares y genéticas de las cardiopatías. *Rev Esp Cardiol* 2006; 6(Supl A):21-30
42. Cybulski MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251:788-791
43. Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukocyte Biol* 1999; 66:698–704
44. Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM. Modified low density lipoprotein and its constituents augments cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95:1262-1270
45. Johson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol* 1994; 144:952-961
46. Ikeda H, Takajo Y, Ichiki K, Ueno T, Maki S, *et al.* Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. *Circulation* 1995; 92:1693-1696.

47. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharret AR, Smith LC, Davis CE, *et al.* Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997; 96:4219-4225
48. Abe Y, El-Masi B, Kimball KT, Pownall H, Reilly CF, *et al.* Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:723-731
49. Frijns CJ.M, Kappelle LJ, Van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke* 1997; 28:2214-2228
50. Ridker P, Hennekens C, Roitman-Johnson B, Stampfer M, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risk of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; 351:88-92
51. Nakada MT, Amin K, Christofidou-Solomidou M, O'Brien CD, Sun J, *et al.* Antibodies against the first Ig-like domain of human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that inhibit PECAM-1-dependent homophilic adhesion block *in vivo* neutrophil recruitment. *J Immunol* 2000; 164:452–462
52. Ge-Xiu L, Da-Ming O, Li-Xin L, Lin-Xi C, Hong-Lin H, *et al.* Probucol inhibits oxidized-low density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to endothelial cells in vitro. *Acta Pharmacol* 2002; 23(6):516-522
53. Seino Y and Ikeda M. Interleukin-6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine* 1994; 6:87-91
54. Rus HG, Vlaicu R and Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis* 1996; 127: 263-271
55. Jialal I, Deavaraj S and Venugopal SK. C-reactive protein: Risk marker or mediator in atherothrombosis? *Hypertension* 2004; 44(14):6-11
56. Shieffer B, Shieffer E, Hlffiker KD, Hlffiker A, Konaven P. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques. *Circulation* 2000; 101:1372-1378
57. Szalai AJ, Agrawal A, Greenhough TJ and Volanakis JE. C-reactive protein structural biology, gene expression and host defence function. *Immunol Res* 1997; 16:127–136
58. Albert MA. The role of C-reactive protein in cardiovascular disease risk. *Curr Cardiol Rep* 2000; 2:274–279
59. Mold C, Du Clos TW, Nakayama S, Edwards KM and Gewurz H. C-reactive protein reactivity with complement and effects on phagocytosis. *Ann NY Acad Sci* 1982; 389:251–262
60. Zhong WJ, Zen Q, Tebo J, Schlottmann K, Coggeshall M and Mortensen RF. Effect of human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signalling. *J Immunol* 1998; 161:2533–2540

61. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski M. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001; 103:1194–1197
62. Woollard KJ, Loryman CJ and Kitas GD. Effects of C-reactive protein on monocyte activation. *Rheumatology* 2001; 40:S1:S3
63. Torsteinsdóttir I, Arvidson NG, Hällgren R, Hakansson L. Monocyte activation in rheumatoid arthritis (RA): increased integrin, Fc gamma and complement receptor expression and the effect of glucocorticoids. *Clin Exp Immunol* 1999; 115:554–560
64. Woollard KJ, Phillips DC and Griffiths HR. Direct modulatory effect of C-reactive protein on primary human monocyte adhesion to human endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 2002; 130:256-262
65. Berk BC, Weintraub WS and Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in “active” coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990; 65:168–172
66. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med.* 2002; 252:283-294
67. Ridker PM, Rifai N, Stamfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentrations of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 101:1767-1772
68. Moncada S, Palmer, R. M. and Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109–142
69. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: 1014-1030
70. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1991; 83:391-401
71. John S, Schlaich M, Langenfeld M, Weihprecht H, Schmitz G, *et al.* Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients. A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Circulation* 1998; 98: 211-216
72. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995; 270:319-324
73. Colomé C, Martínez-González J, Vidal F, De Castellarnau C, Badimon L. Small oxidative changes in atherogenic LDL concentrations irreversibly regulates adhesiveness of human endothelial cells: effect of the lazaroid U74500A. *Atherosclerosis* 2000; 149:295-302
74. Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1999; 103:897-905

75. Martínez-González J, Raposo B, Rodríguez C, Badimon L. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of native LDLs. Balance between transcriptional and post-transcriptional regulation. *Arterioscler Thromb Vascular Biol* 2001; 21:804-809
76. Boger Rh, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98:1842-1847
77. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 1998; 97:2494-2498
78. Vilahur G, Segalés E, Salas E, Badimon L. Effects of a novel platelet NO-donor (LA816), aspirin, clopidogrel and combined therapy in inhibiting flow and lesion-dependent thrombosis in the porcine ex vivo model. *Circulation* 2004; 110:1686-1693
79. Mendelson ME, O'Neill S, George D, Loscalzo J. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem* 1990; 265(31):19028-19034
80. Zhang J, Patel JM, Li YD and Block ER. Proinflammatory cytokines downregulate gene expression and activity of constitutive nitric oxide synthase in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 96:71–87
81. Zhong L, You J and Sun Q. The role of NF- κ B in the TNF- α -induced endothelial cell apoptosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999; 79:863–866
82. Picchi, A., Gao, X., Belmadani, S, *et al.* Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ Res* 2006; 99:69–77
83. Gao X, Belmadani S, Picchi A, *et al.* Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in Leprdb mice. *Circulation* 2007; 115:245–254
84. Bruunsgaard, H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J Leukocyte Biol* 2005; 78:819–835
85. Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis* 1985; 5:293-302
86. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA Jr. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:10417-10422

87. Nagel T, Resnick N, Dewey CF, Gimbrone MA Jr. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1825-1834
88. Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9:697-698
89. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15:1667-1687
90. Van Belle E, Bauters C, Asahara T, Isner JM. Endothelial regrowth after arterial injury: from vascular repair to therapeutics. *Cardiovas Res* 1998; 38:54-68
91. Collins T. Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993; 68:499-508
92. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:141-179
93. Rothwarf DM, Karin M. The NF- κ B Activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Science's Signal Transduction Knowledge Environment* 1999; 5:1-16
94. Grilli M, Chiu JJ, Lenardo M. NF- κ B and Rel: participants in a multifunctional transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 1993; 143:1-62
95. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 1997; 388:548-554
96. Bourcier T, Sukhova G, Libby P. The nuclear factor κ -B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J Biol Chem* 1997; 272:15817-15824
97. Sheppard KA, Rose DE, Haque ZK, Kurokawa R, McInerney E, Westin S, et al. Transcriptional activation by NF- κ B requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol* 1999; 19:6367-6378
98. Ditschuneck M, Weiss G. Central role of transcription factor NF- κ B for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol* 1999; 162:6171-6177
99. Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:752-756
100. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmborg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 1995; 270:286-290
101. Egido J, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Blanco-Colio LM, Ortego M, et al. Transcription factor- κ B (NF- κ B) and cardiovascular disease. *Cardiovascular Risk Factors* 2000; 9:146-155

102. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, *et al.* Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5134-5138
103. Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB. *Circulation* 2000;102:1970-1976
104. Ortego M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Díaz C, *et al.* Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 1999; 147:253-261
105. Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, *et al.* Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 1997; 96: 2262-2271
106. Obata H, Biro S, Arima N, Kaieda H, Kihara T, *et al.* NFkappa B is induced in the nuclei of cultured rat aortic smooth muscle cells by stimulation of various growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224:27-32
107. Beg AA, Baltimore D. An Essential Role for NF-kB in Preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 1996; 274:782-784
108. Hiscott J, Known H, Génin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kB pathway. *J Clin Invest* 2001; 107:143-151
109. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, *et al.* Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996; 97:1715-1722
110. Landry DB, Couper LL, Bryant SR, Lindner V. Activation of the NFkappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Pathol* 1997; 151:1085-1095
111. Ritchie ME. Nuclear factor-kappa B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation* 1998; 98:1707-1713.
112. Yasaka, T, Mantich N.M., Boxer L.A. and Baehner R.L. Functions of human monocyte and lymphocyte subsets obtained by countercurrent centrifugal elutriation: differing functional capacities of human monocyte subsets. *Eur J Immunol* 1981.127:1515-1518
113. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM and Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 1998; 282-480
114. Muller WA and Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukocyte Biol* 1999; 66:698-704

115. Shaw S and Luce GG. The lymphocyte function associated LFA-1, CD2/LFA-3 pathways of antigen-independent human T cell adhesion. *J Immunol* 1987; 139(4):1037-1045
116. Arenson EB Jr, Epstein MB, Seeger RC: Volumetric and functional heterogeneity of human monocytes. *J Clin Invest* 1980, 65:613-618.
117. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW: Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989, 74:2527-2534
118. Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, *et al.* The novel subset of CD14+CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 1993; 23:2053-2058
119. Ziegler-Heitbrock HWL, Passlick B, Flieger D. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma* 1988; 7:521-527
120. Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Shütt C, Passlick B and Pfore A. The novel subset of CD14+CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 1993; 23:2053-2058
121. Merino A, Buendia P, Martin-Malo A, Aljama P, Ramirez R, Carracedo J. Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J Immunol* 2011; 186(3):1809-1815
122. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pfore A, Ziegler-Heitbrock HWL. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 1996; 87:373-377
123. Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, *et al.* Functional contribution of elevated circulating and hepatic nonclassical CD14+CD16+ monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One* 2010, 5: e11049
124. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F, *et al.* Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 2010; 115:e10-19
125. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, *et al.* Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16- monocytes. *J. Exp. Med* 2003; 197:1701–1707
126. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, *et al.* Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997; 91:521–530
127. Ancuta P, Wang J and Gabuzda D. CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2 and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells. *J Leukoc Biol* 2006; 80:1156-1164
128. Starikova EA, Lebedeva AM, Freidlin IS. CD14++CD16- and CD14+CD16+ human monocytes adhesion to endothelial cells. *Tsitologiya* 2010; 52 (5):380-383

129. Inadera H, Egashira K, Takemoto M, Ouchi Y, Matsushima K. Increase in circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 with aging. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19:1179-1182.
130. Poltorak A, He L, Smirnova MY, Liu CV, Van Huffel X, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. *Science* 1998; 282:2085-2088
131. Ziegler-Heitbrock HWL. The CD14+CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007; 81:584-592
132. Belge KUF, Dayyani A, Horelt M, Siedlar M, Frankenberger B, *et al.* The proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes are a major source of TNF- α . *J Immunol* 2002; 168:3536-3542
133. Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, *et al.* Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol* 2009, 30:325-333
134. Seidler S, Zimmermann HW, Bartneck M, Trautwein C, Tacke F. Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC Immunol* 2010;11:30
135. Landsman L, Bar-On L, Zernecke A, Kim KW, Krauthgamer R, *et al.* CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 2009;113:963-972
136. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, *et al.* Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 2007; 117:185-194
137. Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, *et al.* Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2375-2378.
138. Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreessen R and Ziegler-Heitbrock HWL. Selective depletion of CD14+CD16+ monocytes by glucocorticoides therapy. *Clin Exp Immunol* 1998; 112:501-506
139. Scherberich JE. Proinflammatory blood monocytes: main effector and target cells in systemic and renal disease; background and therapeutic implications. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003; 41(10):459-464
140. Rogacev KS, Ulrich C, Blömer L, Hornof F, Oster K, *et al.* Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J* 2010; 31:369-376
141. Schlitt, A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, *et al.* CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF- α levels. *Thromb. Haemost* 2004; 92:419–424
142. Barisione C, Garibaldi S, Ghigliotti G, Fabbi P, Altieri P, *et al.* CD14+CD16+ monocyte subset levels in heart failure patients. *Dis Markers* 2010; 28(2):115-124
143. Patiño R, Ibarra J, Rodríguez A, Yagüe MR, Pintor E, *et al.* Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. *Am J Cardiol* 2000; 86(9):1054-1055
144. Hakkinen, T., Karkola, K., Yla-Herttuala, S. Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16 (Fc γ RIII). *Virchows Arch* 2000; 437: 396–405

145. Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stöhr J, *et al.* Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:1437–1447
146. Rouzaut A, Subirá ML, de Miguel C, Domingo-de-Miguel E, González A, *et al.* Co-expression of inducible nitric oxide synthase and arginases in different human monocyte subsets. Apoptosis regulated by endogenous NO. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1451(2-3):319-33
147. Cuschieri J. Oxidant alterations in CD16 expression are cytoskeletal induced. *Shock* 2009; 32(6):572-577
148. Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338-344
149. Lin E, Freedman JE, Beaulieu LM. Innate immunity and toll-like receptor antagonists: a potential role in the treatment of cardiovascular diseases. *Cardiovasc Ther* 2009; 27: 117-23
150. Pasterkamp G, Van Keulen JK, De Kleijin DP. Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. *Eur J Clin Invest* 2004; 34(5):328-334
151. Yang J, Jin LY, Ding JW, Zhou YQ, Yang J, *et al.* Expression of Toll-like Receptor 4 on peripheral blood mononuclear cells and its effects on patients with acute myocardial infarction treated with Thrombolysis. *Arch Med Research* 2010; 41:423-429
152. Lu YC, Yeh WC, Ohashi S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 42(2):145-151
153. Chong AJ, Shimamoto A, Hampton CR, *et al.* Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 128:170-179
154. Otsui K, Inoue N, Kobayashi S, Shiraki R, Honjo T, *et al.* Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries. *Heart Vessels* 2007; 22:416-422
155. Sloane JA, Blitz D, Margolin Z and Vartanian T. A clear and present danger: endogenous ligands of Toll-like receptors. *Neuromolec Med* 2010; 12:149-163
156. Yang J, Yang J, Ding JW, Chen LH, Wang YL, *et al.* Sequential expression of TLR4 and its effects on the myocardium of rats with myocardial ischemiareperfusion injury. *Inflammation* 2008; 31: 304-312
157. Magder S, Neculcea J, Neculcea V, *et al.* Lipopolysaccharide and TNF-alpha produce very similar changes in gene expression in human endothelial cells. *J Vasc Res* 2006; 43:447-461
158. Lien E, Means TK, Heine H *et al.* Toll Like receptor 4 impairs ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 2000; 105:497-504.
159. Ishikawa Y, Satoh M, Itoh T, Minami Y, Takahashi Y and Ayamura M. Local expression of Toll-like receptor 4 at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction. *Clin Sci* 2008; 115:133-140
160. Methe H, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M and Koglin J. Expansion of circulating Toll-like receptor 4 positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 2005; 111:2654-2661
161. Girndt M, Ulrich C, Kaul H, Sester U, Sester M and Köhler H. Uremia-associated immune defect: the IL-10-CRP axis. *Kidney Int* 2003; 63 [Suppl 84]:S76–S79

162. Wanner C, Zimmerman J, Schwedler S and Metzger T. Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients. *Kidney Int* 2002; 61(Suppl 80):S99-S102
163. Pereira BJG, Shapiro L and King AJ. Plasma levels of IL-1 β , TNF- α and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney Int* 1994; 45:890-896
164. Jacobson SH, Egberg N, Hylander B and Lundahl J. Correlation between soluble markers of endothelial dysfunction in patients with renal failure. *Am J Nephrol* 2002; 22(1):42-47
165. Yao Q, Axelsson J, Heimbürger O, Stenvinkel P, Lindholm B. Systemic inflammation in dialysis patients with end stage renal disease: causes and consequences. *Minerva Urol Nefrol* 2004; 56:237-248
166. Steinvinkel P, Alvestrand A. Inflammation in end-stage renal disease: Sources, consequences, and therapy. *Semin Dial* 2002; 15:329-332
167. Pecoits-Filho R, Goncalves S, Barberato SH, Bignelli A, Lindholm B, et al. Impact of residual renal function on volume status in chronic renal failure. *Blood Purif* 2004; 22(3): 285-292
168. Pecoits-Filho R, Barany P, Lindholm B, Heimbürger O, Stenvinkel P. Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:1684-1688
169. Docci D, Bilancioni R, Baldrati L, Capponcini C, Turciii F and Feletti C. Elevated acute phase reactants in hemodialysis patients. *Clin Nephrology* 1990; 34:88-91
170. Fortes PC, Versari PH, Stinghen AE and Pecoits-Filho R. Controlling inflammation in peritoneal dialysis: the role of PD-related factors as potential intervention targets. *Perit Dial Int* 2007; Suppl 2:S76-S81
171. Garcia E, Carrero JJ, Suliman ME, Lindholm B, Stenvinkel P. Risk factors for cardiovascular disease in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 2007; Suppl 2:S205-209
172. Schindler RR, Boenish OO, Fisher CC, Frei U. Effect of the hemodialysis membrane on the inflammatory reaction in vivo. *Clin Nephrol* 2000; 53:452-459
173. Linnenweber S, Lonnemann G. Effects of dialyzer membrane on interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-1 β -converting enzyme in mononuclear cells. *Kidney Int* 2001; Suppl 78:S282-S285
174. Memoli B, Libetta C, Rampino T, Dal Canton A, Conte G, Scala G, Ruocco MR and Andreucci VE. Hemodialysis related induction of interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells. *Kidney Int* 1992; 42:320-326
175. Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 1999; 55:341-356
176. Rangan GK, Kan G, Steer JH, Dogra G, Croft KD, et al. Altered expression of nuclear factor-kappa B in peripheral Blood mononuclear cells in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(4):1137-1139
177. Pecoits-Filho P, Lindholm B, Axelsson J, Stenvinkel P. Update on interleukin-6 its role in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:1042-1045
178. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein critical update. *J Clin Invest* 2003; 111: 1805-1812.

179. Owen WF, Lowrie EG. C-reactive protein as an outcome predictor for maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int* 1998; 54:627-636
180. Cueto-Manzano AM, Morales-Buenrostro LE, **González-Espinoza L**, **González-Tableros N**; Martin-del-Campo F, *et al.* **Markers of Inflammation Before and After Renal Transplantation.** *Transplantation* 2005; 80:47-51.
181. Pawlak K, Naumnik B, Brzosko S, Pawlak D, Mysliwiec M. Oxidative stress a link between endothelial injury, coagulation activation, and atherosclerosis in haemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2004; 24:154-161
182. Ohkuma T, Minagawa T, Takada N, Ohno M, Oda H and Ohashi H. C-reactive protein, lipoprotein(a), homocysteine, and male sex contribute to carotid atherosclerosis in peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 42:355-361
183. Leskinen Y, Groundstroem K, Virtanen V, Lehtimäki T, Huhtala H and Saha H. Risk factors for aortic atherosclerosis determined by transesophageal echocardiography in patients with CRF. *Am J Kidney Dis* 2003; 42:277-285
184. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Steinvinkel P. The malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA) syndrome-the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(Suppl 11):28-31
185. London GM, Marchais SJ, Guérin AP, Metivier F, Adda H and Pannier B. Inflammation, arteriosclerosis, and cardiovascular therapy in hemodialysis patients. *Kidney Int Suppl.* (supl 84): 2003; S88-S93
186. Varaganam M, Finney H, Trevitt R, Sharples E, McCloskey DJ, *et al.* Pretransplantation levels of C-reactive protein predict all-cause and cardiovascular mortality, but not graft outcome, in kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2004; 43:502-507
187. Ducloux D, Kazory A, Chalopin JM. Predicting coronary heart disease in renal transplant recipients: a prospective study. *Kidney Int* 2004; 66:441-447
188. Busch M, Franke S, Müller A, Wolf M, Gerth J, *et al.* Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites and C-reactive protein. *Kidney Int* 2004; 66:338-347
189. Bergström J and Lindholm B. Malnutrition, Cardiac Disease and Mortality: An Integrated Point of View. *Am J Kidney Dis* 1998; 32:834-841
190. Mekki K, Taleb W, Bouzidi N, Kaddous A and Bouchenak M. Effect of hemodialysis and peritoneal dialysis on redox status in chronic failure patients: a comparative study. *Lipids Health Dis* 2010; 9:93
191. Cueto-Manzano AM, Salazar M, Valera-Gonzalez I, Rojas-Campos E, Martinez-Ramirez HR, *et al.* Association between the peritoneal transport rate and systemic inflammation marker in continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:201A
192. Kaizu Y, Kimura M, Yoneyama T, Miyaji K, Hibi I, Kumagai H. Interleukin-6 may mediate malnutrition in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1998; 31:93-100
193. Hakim RM, Lazarus JM. Initiation of dialysis. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6:1319-1328

194. Holland D, Lam M. Predictors of hospitalization and death amongst pre-dialysis patients: a retrospective study. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:650-658
195. Bowden RG and Wilson RL. Malnutrition, inflammation and lipids in a cohort of dialysis patients. *Postgrad Med* 2010; 122(3):196-202
196. Mitch WE, Maroni BJ. Factors causing malnutrition in patients with chronic uremia. *Am J Kidney* 1999; 33:176-179
197. Eustace JA, Astor B, Muntner PM, Ikizler TA, Coresh J. Prevalence of acidosis and inflammation and their association with low serum albumin in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2004; 65(3):1031-1040
198. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM and Packer. Elevated Circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990; 323: 236-241
199. Yang WS, Kim SB, Min WK, Park S, Lee MS, Park JS. Atherogenic lipid profile and lipoprotein (a) in relation to serum albumin in hemodialysis patients *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10:1668-1671
200. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336(14): 973-979
201. Merino A, Portolés J, Selgas R, Ojeda R, Buendia P, *et al.* Effect of Different Dialysis Modalities on Microinflammatory Status and Endothelial Damage. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5(2):227-234
202. Carracedo J, Ramirez R, Soriano S, Alvarez de Lara MA, Rodriguez M, *et al.* Monocytes from dialysis patients exhibit characteristics of senescent cells: Does it really mean inflammation? *Contrib Nephrol* 2005; 149:208-218
203. Ramirez R, Carracedo J, Soriano S, Jimenez R, Martin-Malo A, *et al.* Stress-induced premature senescence in mononuclear cells from patients on long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2005; 45:353-359
204. Jimenez R, Carracedo J, Santamaria R *et al.* Replicative senescence in patients with chronic kidney failure. *Kidney Int* 2005; 68 (Suppl 99):11S–15S
205. Ramírez R, Carracedo J, Merino A, Nogueras S, Alvarez-Lara MA, *et al.* Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients. The role of convective transport. *Kidney Int* 2007; 72:108-113
206. Merino A, Nogueras S, Buendía P, Ojeda R, Carracedo J, Ramirez-Chamond R, Martin-Malo A, Aljama P. Microinflammation and endothelial damage in hemodialysis. *Contrib Nephrol* 2008; 161:83-88
207. Ramírez R, Carracedo J, Soriano S, Jimenez R, Martín-Malo A, *et al.* Stress-induced premature senescence in mononuclear cells from patients on long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 353–359
208. Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, Reichart B, Herath E, *et al.* CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J* 2011; 32(1):84-92. (*Epub* 2010 Oct 12)
209. Satoh T, Saionji K. Plasma macrophage colony-stimulating factor level and changes of monocyte subpopulations in chronic renal failure patients treated with hemodialysis. *Rinsho Byori* 1999; 47(4):359-364

210. Nockher WA and Scherberich JE. Expansion of CD14+CD16+ blood monocytes in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: possible involvement of macrophage colony-stimulating factor. *Acta Haematol* 2001; 105:21-26
211. Cappelli G, Tetta C, Canaud B. Is biofilm a cause of silent chronic inflammation in haemodialysis patients? A fascinating working hypothesis. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:266–270
212. Schindler R, Beck W, Deppisch R, Aussieker M, Wilde A, *et al.* Short bacterial DNA fragments: detection in dialysate and induction of cytokines. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:3207–3214
213. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:709–760
214. Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, *et al.* Human TLR-9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpGmotif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9237–9242
215. Heine GH, Ulrich C, Seibert E, Seiler S, Marell J, *et al.* CD14+CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int* 2008; 73 (5):622-629
216. Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlöf B, *et al.* Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16:149–160
217. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352:1685–1695
218. Ulrich C, Heine Gunnar, Garcia P, Reichart B, Georg, T, *et al.* Increased expression of monocytic angiotensin-converting enzyme in dialysis patients with cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:1596-1602
219. Metzger R, Bohle RM, Chumachenko P, Danilov SM, Franke FE. CD143 in the development of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2000; 150:21–31
220. Ulrich C, Heine GH, Seibert E, Fliser D, Girndt M. Circulating monocyte subpopulations with high expression of angiotensin-converting enzyme predict mortality in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(7):2265-2272
221. Ulrich C, Heine GH, Gerhart MK, Köhler H, Girndt M. Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients. *Am J Transplant* 2008; 8(1):103-110 (Epub 2007 Nov 12)
222. Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease failure: could it be treated? *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(supl 8):S33-S38
223. Cueto Manzano AM, Rojas Campos E, Martinez Ramírez HR, Valera González I, *et al.* Can the inflammation markers of patients with high peritoneal permeability on continuous ambulatory peritoneal dialysis be reduced on nocturnal intermittent peritoneal dialysis? *Perit Dial Int* 2006; 26(3):341-348
224. Bloembergen WE, Hakim RM, Stannard DC, Held PJ, Wolfe RA, *et al.* Relationship of dialysis membrane and cause-specific mortality. *Am J Kidney Dis* 1999; 33:1-10

225. Vane J. The evolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their mechanisms of action. *Drugs* 1987; 33: (Suppl 1):S18-S27
226. Gullestad L, Ueland T, Fjeld JG, Holt E, Gundersen T. Effect of thalidomide on cardiac remodeling in chronic Herat failure (results of a doble-blind, placebo-controlled study). *Circulation* 2005; 112(22):3408-3414
227. Alvarez V, Díez JJ, Aguilera A, Selgas R, Codoceo R and Bajo MA. Anorexia in end-stage renal disease: pathophysiology and treatment. *Expert Opin Pharmacother* 2001; 2(11):1825-1838
228. Hung AM, Ellis CD, Shintani A, Booker C and Ikizler TA. IL-1 β receptor antagonist reduces inflammation in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(3):437-442
229. Don BR, Kim K, Dwyer LT, Alexander F, Kaysen GA. The effect of etanercept on supresión of the systemic inflammatory response in chronic hemodialysis pateintes. *Clin Nephrol* 2010, 73: 431-438
230. Stenvinkel P, Andersson P, Wang T, Lindholm B, Bergstöm J, et al. Do ACE-inhibitors supress tumour necrosis factor-alpha production in advanced chronic renal failure? *J Int Med* 1999; 246:503-507
231. Chang JW, Yang WS, Min WK, Lee SK, Park JS, et al. Effects of simvastatin on high-sensitivity C-reactive protein and serum albumin in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2002; 39:1213-1217
232. Vernaglion L, Cristofano C, Muscogiuri P, Chimienti S. Does atorvastatin influence serum C-reactive protein levels in patients on long-term hemodialysis? *Am J Kidney Dis* 2004; 43:471-478
233. Ordaz-Medina SM, González-Plascencia J, Martin del Campo F, Rojas-Campos E, Espinoza-Gómez F and Cueto-Manzano AM. Is systemic inflammation of hemodialysis patients improved with the use of enalapril? Results of a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *ASAIO J* 2010;56(1):37-41
234. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003; 107:363-369
235. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic síndrome and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14719 initially healthy American women. *Circulation* 2003; 107:391-397
236. Kim SB, Lee SK, Min WK, Chi HS, Park JS. Lack of effects of low-dose aspirin on high-sensitivity C-reactive protein, hemostatic factors, and troponin T in CAPD patients. *Perit Dial Int* 2002; 22:721-723
237. Strano A, Davi G, Avellone G, Novo S and Pinto A. Double-blind, crossover study of the clinical efficacy and the hemorheological effects of Pentoxifylline in patients with occlusive arterial disease of the lower limbs. *Angiology-J Vasc Dis* 1984; 35(7):459-466
238. Drug information online: <http://drugs.com>
239. Schröer, RH. Antithrombotic potencial of pentoxifylline. A hemorheologically active drug. *Angiology* 1985; 36(6):387-398
240. Jarret PEM, Moreland M, Browse NL: The effect of pentoxifylline (Trental) of fibrinolytic activity and plasma fibrinogen levels. *Curr Med Res Opin* 1977; 4(7):492-495

241. Pinzani M, Marra F, Caligiuri A, DeFranco R, Gentilini A, *et al.* Inhibition by pentoxifylline of extracellular signal-regulated kinase activation by platelet-derived growth factor in hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 1996; 119 (6):1117-1124
242. Dominguez-Jimenez C, Sancho D, Nieto M, Montoya M, Barreiro O, *et al.* Effect of pentoxifylline on polarization and migration of human leukocytes. *J Leukoc Biol* 2002; 71:588-596
243. D'Angelo G, Lee H and Weiner RI. cAMP-dependent protein kinase inhibits the mitogen action of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor in capillary endothelial cells by blocking Raf activation. *J Cell Biochem* 1997; 67:353-366
244. Neumann M, Grieshammer T, Chuvpilo S, Kneitz B, Lohoff M, *et al.* RelA/p65 is a molecular target for immunosuppressive action of protein kinase A. *EMBO* 1995; 14:1991-2004
245. Lee KS, Cottam M, Houghlum K, Wasson DB, Carson D and Chojkier M. Pentoxifylline blocks hepatic stellate cell activation independently of phosphodiesterase inhibitory activity. *Am J Physiol* 1997; 273:G1094-G1100
246. Biswas DK, Ahlers CM, Dezube BJ and Pardee AB. Pentoxifylline and other protein kinase inhibitors down-regulate HIV-LTR NF- κ B induced gene expression. *Mol Med* 1994; 1:31-43
247. Chen YM, Tu CJ, Hung KY, Wu KD, Tsai TJ, Hsieh BS. Inhibition by pentoxifylline of TNF- α stimulated fractalkine production in vascular smooth muscle cells: evidence for mediation by NF-Kappa B down regulation. *Br J Pharmacol* 2003; 138(5):950-958
248. Doherty GM, Jensen JC, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery* 1991; 110:192-198
249. Schwarz T, Urbanski A and Trautinger F. Pentoxifylline blocks the elicitation phase of contact hypersensitivity and irritant dermatitis. *J Invest Dermatol* 1992; 98:593
250. Schwarz T, Schwarz A, Krone Ch and Luger TA. Pentoxifylline suppresses allergic patch test reaction in humans. *Arch Dermatol* 1993; 129:513
251. Neuner P, Klosner G, Schauer E, Pourmojib M, Macheiner W. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1b, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor- α by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology* 1994. 83:262-267.
252. Ueki A, Sai T, Oka H, Tabata M, Hosokawa K and Mochisuki Y. Biosynthesis and secretion of the third component of complement by human endothelial cells in vitro. *Immunol* 1987; 61:11-14
253. Brooimans RA, Van Der Ark AAJ, Buurman WA, Van Es LA, Daha MR. Differential regulation of complement factor H and C3 production in human umbilical vein endothelial cells by IFN-gamma and IL-1. *J Immunol* 1990; 144:3835-3840
254. Kawakami Y, Watanabe Y, Yamaguchi M, Sakaguchi H, Kono I, Ueki A. TNF- α stimulates the biosynthesis of complement C3 and factor B by human umbilical cord vein endothelial cells. *Cancer Lett* 1997; 116(1):21-26

255. Hoie EB, McGuire TR, Leuschen PM and Zach TL. Pentoxifylline inhibits tumor necrosis factor- α induced synthesis of complement component C3 in human endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(10):1670-1673
256. Sliwa K, Woodiwiss A, Kone VN, Candy G, Badenhorst D, *et al.* Therapy of ischemic cardiomyopathy with the immunomodulating agent pentoxifylline: results of a randomized study. *Circulation*. 2004;109 (6):750-755
257. Sliwa K, Studick D, Geoffrey C. Randomized investigation of effects of pentoxifylline on left-ventricular performance in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1998, 351: 1091-1093
258. Batchelder K, Mayosi BM. Pentoxifylline for heart failure: a systematic review. *S Afr Med J* 2005; 95(3):171-175
259. Gallardo JM; de Carmen Prado UM; Amato D and Paniagua R. Inflammation and oxidative stress markers by pentoxifylline treatment in rats with chronic renal failure and high sodium intake. *Arch Med Res* 2007; 38(1):34-38
260. Navarro FJ, Mora C, Rivero A, Gallego E, Chahin J, *et al.* Urinary protein excretion and serum Tumor Necrosis Factor in diabetic patients with advanced renal failure: effects of pentoxifylline administration. *Am J Kidney Dis* 1999; 33(3):458-463
261. Cooper A, Mikhail A, Lethbridge MW, Kemeny DM and Macdougall IC. Pentoxifylline improves haemoglobin levels in patients with erythropoietin-resistant anaemia in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1877-1882
262. Gonzalez-Espinoza L, Rojas-Campos E, Medina-Pérez M, Peña-Quintero P, Gómez-Navarro B and Cueto-Manzano AM. Pentoxifylline decreases serum levels of tumor necrosis factor α , interleukin 6 and C-reactive protein in hemodialysis patients: results of randomized double-blind, controlled clinical trial. *Nephrol Dial Transplant* 2011; [Epub ahead of print]
263. Jeyaseelan L, Rao PS. Methods of determining sample sizes in clinical trials. *Indian Pediatr* 1989; 26: 115-121
264. Lima LM, Carvalho MD, Fonseca Neto CP, Garcia JC and Sousa MO. PAI-1 4G/5G polymorphism and plasma levels association in patients with coronary artery disease. *et al, Arq Bras Cardiol* 2011; [ahead print]
265. Ishii H, Nakano M, Tsubouchi J, Ishikawa T, Uchiyama H, Hiraishi S, Tahara C, Miyajima Y, Kazama M. Establishment of enzyme immunoassay of human thrombomodulin in plasma and urine using monoclonal antibodies. *Thromb Haemost* 1990; 63:157-162
266. Sorell L, Rojas G, Rodriguez M, Ramos C, Torres L and Torres MB. A sandwich ELISA based on anti-apo(a) and anti-apo B monoclonal antibodies for lipoprotein(a) measurement. *Clin Chim Acta* 1995; 236:59-70
267. Bednarek-Skublewska A, Buraczynska M, Wawrzycki S, Baranowicz-Gaszczyk I and Ksiazek A. Some aspects of homocysteine metabolism in hemodialysis patients. *Pol Arch Med Wewn* 2002; 108(5):1041-1047

268. Connolly GM, Cunningham R, McNamee PT, Young IS and Maxwell AP. Elevated soluble cellular adhesion molecules are associated with increased mortality in a prospective cohort of renal transplant recipients. *BMC Nephrol* 2011, 22(12):23
269. Satioglu O, Uydu HA, Demir A, Bostan M, Atak M and Bozkurt E. Association between plasma monocyte chemoattractant protein-1 levels and the extent of atherosclerotic peripheral artery disease. *Tohoku J Exp Med* 2011, 224(4):301-306
270. Pan Q, Chathery Y, Wu Y, Rathore N, Tong RK, *et al.* Nrp1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *J Biol Chem* 2007; 282(33): 24049-24056
271. Cox DA and Maurer T. Transforming growth factor-beta. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 83(1): 25-30
272. Eming SA, Yarmush ML, Krueger GG and Morgan JR. Regulation of the spatial organization of mesenchymal connective tissue: effects of cell-associated vs release isoforms of platelet-derived growth factor. *Am J Pathol* 1999; 154(1): 281-289
273. Holvoet P, Cleemput H and Collen D. Assay of human tissue-type plasminogen activator (t-PA) with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on three murine monoclonal antibodies to t-PA. *Thromb Haemost* 1985; 54: 684-687
274. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 1987; 34: 50-97
275. Canon ME, Crimmins EM. Sex Differences in the association between Muscle Quality, Inflammatory Markers and Cognitive Decline. *J Nut Health Aging* 2011; 15(8):695-698
276. Ahmadi N, Eshaghian S, Huizenga R, Sosnin K, Ebrahimi R, *et al.* Effects of intense exercise and moderate caloric restriction on cardiovascular risk factors and inflammation. *Am J Med* 2011; 124(10): 978-982
277. Jungers P, Choukroun G, Robino C *et al.* Epidemiology of end-stage renal disease in the Ile-de-France area: a prospective study in 1998. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 2000–2006
278. López Revuelta K, Saracho R and García López F. Informe de diálisis y trasplante año 2001 de la Sociedad Española de Nefrología y Registros Autonómicos. *Nefrología* 2004; 24: 21–33
279. Cruz JM, Píera L, Bragg-Gresham JL, Feldman H, Port FK. Results of the international hemodialysis study DOPPS in Spain and Europe. *Nefrología* 2003; 23(5):437-443
280. Garcia-Donaire JA, Ruilope LM. Systolic pressure, diastolic pressure, or pulse pressure as a cardiovascular risk factor in renal disease. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12(4):307-312
281. Renke M, Tylicki L, Rutkowski P, Narcyz Knap, Zietkiewicz M, *et al.* Effect of pentoxifylline on proteinuria, markers of tubular injury and oxidative stress in non-diabetic patients with chronic kidney disease – placebo controlled, randomized, cross-over study. *ABP* 2010; 57(1):119-123
282. U.S.A. National kidney Foundation K/DOQI Guidelines.
http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_commentaries.cfm#guidelines

283. Nissenson AR, Prichard SS, Cheng IK, *et al.* Non-medical factors that impact on ESRD modality selection. *Kidney Int Suppl* 1993; 40:S120-S127
284. Serre AF, Marie C, Beaujon G, Betail G, Cavaillon JM, Deteix P. Variations of cytokine levels and production in CAPD patients. *Int J Artif Organs* 1997; 20:614–621
285. Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B. Beyond the membrane—the role of new PD solutions in enhancing global biocompatibility. *Kidney Int Suppl* 2003; 88:S124–S32
286. Chung SH, Heimbürger O, Stenvinkel P, Wang T, Lindholm B. Influence of peritoneal transport rate, inflammation, and fluid removal on nutritional status and clinical outcome in prevalent peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 2003; 23:174–183
287. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, *et al.* IL-10, IL-6, and TNF- α : central factors in the altered cytokine network of uremia—the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 2005; 67:1216–1233
288. Churchill DN, Thorpe KE, Nolph KD, Keshaviah PR, Oreopoulos DG, Page D. Increased peritoneal membrane transport is associated with decreased patient and technique survival for continuous peritoneal dialysis patients. The Canada-USA (CANUSA) Peritoneal Dialysis Study Group. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:1285–1292
289. Brimble KS, Walker M, Margetts PJ, Kundhal KK, Rabbat CG. Meta-analysis: peritoneal membrane transport, mortality, and technique failure in peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:2591–2598
290. Rabindranath KS, Adams J, Ali TZ, MacLeod AM, Vale L, *et al.* Continuous ambulatory peritoneal dialysis versus automated peritoneal dialysis for end-stage renal disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 18(2):CD006515
291. Vicente-Martinez M, Martinez-Ramirez L, Muñoz R, Avila M, Ventura MD, *et al.* Inflammation in patients on peritoneal dialysis is associated with increased extracellular fluid volume. *Arch Med Res* 2004; 35(3):220-224
292. Méndez DA and Fermín PJG. Mortality in peritoneal dialysis; comparative study of continuous ambulatory peritoneal dialysis versus automated peritoneal dialysis. *Rev Fac Med UNAM* 2009; 52(5):199-203.
293. Hung AM, Alp Ikizler T. Hemodialysis central venous catheters as source of inflammation and its implications. *Semin Dial* 2008; 21(5):401-404
294. Kerr PG, Sutherland WH, de Jong S, Vaithalingham I, Williams SM and Walker RJ. The impact of standard high-flux polysulfone versus novel high-flux polysulfone dialysis membranes on inflammatory markers: a randomized, single-blinded, controlled clinical trial. *Am J Kidney Dis* 2007; 49(4):533-539
295. Wilflingseder J, Perco P, Kainz A, Korbély R, Mayer B and Oberbauer R. Biocompatibility of haemodialysis membranes determined by gene expression of human leucocytes: a crossover study. *Eur J Clin Invest* 2008; 38(12):918-24

296. Martin del Campo F, Batis Ruvalcaba C, Gonzalez Espinoza L, Rojas Campos E, Angel JR, *et al.* Dietary Micronutrient intake in peritoneal dialysis patients: Relationship with nutrition and inflammation status. *Perit Dial Int* 2011; [Epub ahead of print]
297. Demarin V, Lisak M, Morovic S and Cengic T. Low high-density lipoprotein cholesterol as the possible risk factor for stroke. *Acta Clin Croat* 2010; 49(4):429-439
298. Prasad K and Lee P. Supression of hypercholesterolemic athrosclerosis by pentoxifylline and its mechanism. *Atherosclerosis* 2007; 192(2): 313-322
299. Grunfeld C, Adi S, Soued M, Moser A, Fiers W and Feingold KR. Search for mediators of the lipogenic effects of tumor necrosis factor: potential role for interleukin 6. *Cancer Reas* 1990; 50(14):4233-4238
300. Wu G, Brouckaert P and Olivecrona T. Rapid downregulation of adipose tissue lipoprotein lipase activity of food deprivation: evidence that TNF-alpha is involved. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286(5): E711-E717
301. Stosovic MD, Naumovic RT, Stanojevic ML, Simic-Ogrizovic SP, Jovanovic DB *et al.* Could the level of serum albumin be a method for assessing malnutrition in hemodialysis patients?. *Nutr Clin Pract* 2011; 26(5): 607-613
302. De Mutsert R, Grootendorst DC, Indemans F, Boeschoten EW, Krediet RT, *et al.* Association between serum albumin and mortality in dialysis patients is partly explained by inflammation, and not by malnutrition. *J Ren Nutr* 2009 Mar; 19(2):127-135
303. Arques S. Serum albumin and heart failure: Recent advances on a new paradigm. *Ann Cardiol Angeiol* 2011; [Epub ahead of print]
304. Shenkin A. Serum Prealbumin: Is It a Marker of Nutritional Status or of Risk of Malnutrition? *Clin Chem* 2006; 52(12):2177–2179
305. Hrnčiarikova D, Jurašková B, Zadak Z, Hronek M. Present state of evaluating malnutrition in the elderly – analysing indicators. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2006; 150(2):217–221
306. Robinson MK, Trujillo EB, Mogensen KM, Rounds J, McManus K, Jacobs DO. Improving nutritional screening of hospitalized patients: the role of prealbumin. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2003; 27:389–395
307. Hrnčiarikova D, Juraskova B, Hyspler R, Solichova D, Ticha A, *et al.* A changed view of serum prealbumin in the elderly: prealbumin values influenced by concomitant inflammation. *Biomed Pap Med Fac Univ Paacky Olomouc Czech Repub* 2007; 151(2):273-276
308. Young YA, Kopple JD, Lindholm B, Vonesh EF, De Vecchi A, *et al.* Nutritional assessment of CAPD patients: an international study. *Am J Kidney Dis* 1991; 17: 462–471
309. Kaysen GA. The microinflammatory state in uremia: causes and potential consequences. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:1549-1557

310. Floege J and Ketteler M. Vascular calcification in patients with end-stage renal renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(Suppl 5):v59-v66
311. Crouse JR 3rd. Thematic review series: patient-oriented research. Imaging atherosclerosis: state of the art. *J Lipid Res* 2006; 47:1677-1699
312. Solerte SB, Fioravanti M, Cerutti N, Severgnini S, Locatelli M, *et al.* Retrospective analysis of long-term hemorheologic effects of pentoxifylline in diabetic patients with angiopathic complications. *Acta Diabetol* 1997; 34:67-74
313. Sliwa K, Woodiwiss A, Kone VN, Candy G, Badenhorst D, *et al.* Therapy of ischemic cardiomyopathy with the immunomodulating agent pentoxifylline: results of a randomized study. *Circulation* 2004; 109:750-755
314. Aviado DM, Porter JM. Pentoxifylline: a new drug for the treatment of intermittent claudication. Mechanism of action, pharmacokinetics, clinical efficacy and adverse effects. *Pharmacotherapy* 1984; 4:297-307
315. Jull A, Waters J, Arroll B. Pentoxifylline for treatment of venous leg ulcers. *Lancet* 2002; 359:1550-1554
316. Bielekova B, Lincoln A, McFarland H, Martin R. Therapeutic potential of phosphodiesterase-4 and -3 inhibitors in Th1-mediated autoimmune diseases. *J Immunol* 2000; 164:1117-1124
317. Beshay E, Croze F, Prud'homme GJ. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production in vitro and in vivo. *Clin Immunol* 2001; 98:272-279
318. Blaine TA, Pollice PF, Rosier RN, Reynolds PR, Puzas JE and O'Keefe RJ. Modulation of the production of cytokines in titanium-stimulated human peripheral blood monocytes by pharmacological agents. The role of cAMP-mediated signaling mechanisms. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79:1519-1528
319. Bhandari V. Developmental differences in the role of interleukins in hyperoxic lung injury in animal models. *Front Biosci* 2002; 7:1624-1633
320. Bhat VB, Madyastha KM. Antioxidant and radical scavenging properties of 8-oxo derivatives of xanthine drugs pentoxifylline and lisofylline. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:1212-1217
321. Coimbra R, Melbostad H, Loomis W, Tobar M, Hoyt DB. Phosphodiesterase inhibition decreases NFkB activation and shifts the cytokine response toward anti-inflammatory activity in acute endotoxemia. *J Trauma* 2005; 59:575-582
322. Ji Q, Zhang L, Jia H, Xu J. Pentoxifylline inhibits endotoxin-induced NFkB activation and associated production of proinflammatory cytokines. *Ann Clin Lab Sci* 2004; 34:427-436
323. Cerami A, Tracey KJ. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 1994; 45:491-503
324. Rieckmann P, Weber F, Günther A, Martin S, Bitsch A, *et al.* Pentoxifylline, a phosphodiesterase inhibitor, induces immune deviation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1996; 64:193-200

325. Martins AMC, Nobre ACL, Almeida AC, Bezerra G, Lima AA, *et al.* Thalidomide and pentoxifylline block the renal effects of supernatants of macrophages activated with *Crotalus durissus cascavella* venom. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37:1525-1530
326. Zabel P, Wolter DT, Schönharting MM and Schade UF. Oxpentifylline in endotoxaemia. *Lancet* 1989; 2(8678-8679): 1474-1477
327. Levi M, ten Cate H, Bauer KA, van der Poll T, Edgington TS, Buller HR, van Deventer SJH, Hack CE, ten Cate JW, Rosenberg RD. Inhibition of endotoxin-induced activation of coagulation and fibrinolysis by pentoxifylline or by a monoclonal anti-tissue factor antibody in chimpanzees. *J Clin Invest* 1994; 93(1):114-120
328. Van Leenen D, van der Poll T, Levi M, ten Cate H, van Deventer SJH, *et al.* Pentoxifylline attenuates neutrophil activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Immunol* 1993; 151(4):2318-2325
329. Schade UF. Pentoxifylline increases survival in murine endotoxin shock and decreases formation of tumor necrosis factor. *Circ Shock* 1990; 31(2):171-181
330. Noel P, Nelson S, Bokulic R, Bagby G, Lippton H, Lipscomb G, Summer W: Pentoxifylline inhibits lipopolysaccharide-induced serum tumor necrosis factor and mortality. *Life Sci* 1990; 47(12):1023-1029
331. Lin HI, Chu SJ, Wang D, Feng NH. Pharmacological modulation of TNF production in macrophages. *J Microbiol Immunol Infect* 2004; 37: 8-15
332. Tong Z, Chen B, Dai H, Bauer PC, Guzman J, Costable U. Extrinsic allergic alveolitis: inhibitory effects of pentoxifylline on cytokine production by alveolar macrophages. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 92(2): 234-239
333. Rieckmann P, Weber F, Gunther A, Günyher A, Martin S, *et al.* Pentoxifylline, a phosphodiesterase inhibitor, induces immune deviation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1996; 64: 193-200
334. Lundblad R, Ekstrom P, Giercksky KE. Pentoxifylline improves survival and reduces tumor necrosis factor, interleukin-6, and endothelin-1 in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. *Shock* 1995; 3:210-215
335. Tukov FF, Luyendyk JP, Ganey PE, Roth RA. The role of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide/ranitidine e induced inflammatory liver injury. *Toxicol Sci* 2007; 100: 267-280
336. Vilcek J and Lee TH. Tumor necrosis factor: new insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991:266:7313-7316
337. Heller RA and Kronke M. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol* 1994; 126:5-9
338. Zampetaki A, Zhongyi Z, Yanhua H and Qingbo X. Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF- κ B signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:H2946-H2954

339. Haider DG, Leuchten N, Schaller G, Gouya G, Kolodjaschna J, *et al.* C reactive protein is expressed and secreted by peripheral blood mononuclear cells. *Clin and Exp Immunol* 2006; 146:533-539
340. Mold C, Rodriguez W, Rodic-Polic B, Du Clos TW. C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with FcγR. *J Immunol* 2002; 169:7019–25
341. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westernfeld R, Ketteler M, *et al.* The serum protein alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin A is a systematically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 2003; 112(3):357-366
342. Ketteler M, Bongartz P, Westernfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, *et al.* Association of low fetuin A concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: across sectional study. *Lancet* 2003; 361: 827-833
343. Kovanen PE, Junttila I, Takaluoma K, Saharinen P, Valmu L, Li W and Silvennoinen O. Regulation of Jak2 tyrosine kinase by protein kinase C during macrophage differentiation of IL-3-dependent myeloid progenitor cells. *Blood* 2000; 95(5):1626-1632
344. Junttila I, Bourette RP, Rohrschneider LR and Silvennoinen O. M-CSF induced differentiation of myeloid precursor cells involves activation of PKC-δ and expression of Pkare. *J Leukocyte Biol*, 2003; 73:281
345. Li G, Kim Y-J, Mantel C and Broxmeyer HE. P-Selectin enhances generation of CD14+CD16+ dendritic-like cells and inhibits macrophage maturation from human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 2003; 171: 669-677
346. Peng Y, Liu H, Liu F, Ouyang L, Cheng M, *et al.* Atherosclerosis is associated with plasminogen activator inhibitor type-1 in chronic haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)* 2008; 13(7):579-586
347. Cigolini M, Tonoli M, Borgato L, Frigotto L, Manzato F, *et al.* Expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human adipose tissue: a role for TNF-α?. *Atherosclerosis* 1999; 143(1):81-90
348. Tarhan OR, Barut I, Sutcu R, Akdeniz Y and Akturk O. Pentoxifylline, a methyl xantine derivate, reduces peritoneal adhesions and increases peritoneal fibrinolysis in rats. *Tohoku J Exp Med* 2006; 209(3):249-255
349. Sadler JE. Thrombomodulin structure and function. *Thromb Haemost* 1997; 78 (Suppl 1):392-395
350. Takano S, Kimura S, Ohdama S, Aoki N. Plasma thrombomodulin in health and diseases. *Blood* 1990; 76:2024-2029
351. Mezzano D, Tagle R, Pais E, Panes O, Pérez M, *et al.* Endothelial cell markers in chronic uremia: relationship with hemostatic defects and severity of renal failure. *Thromb Res* 1997; 88:465-472
352. Hergesell O, Andrassy K, Geberth S, Nawroth P, Gabath S. Plasma thrombomodulin levels are dependent on renal function. *Thromb Res* 1993; 72:455-458
353. Borawski J, Naumnik B, Pawlak K and Mysliwiec M. Soluble thrombomodulin is associated with viral hepatitis, blood pressure, and medications in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(4):787-792

354. Omichi M, Matsusaki M, Kato S, Maruyama I and Arashi M. Enhancement of the blood compatibility of dialyzer membranes by the physical adsorption of human thrombomodulin. *J Biomed Res B Appl Biomater* 2010; 95(2):291297
355. Ondama S, Takano S, Ohashi K, Miyake S and Aoki N. Pentoxifylline prevents tumor necrosis factor-induced suppression of endothelial cell surface thrombomodulin. *Thromb Res* 1991; 62(6): 745-755
356. Ohdama S, Takano S, Ohashi K, Miyake S and Aoki N. Pentoxifylline prevents tumor necrosis factor-induced suppression of endothelial cell surface thrombomodulin. *Thromb Res* 1991; 62(6):745-755
357. Danesh J, Collins R, Peto R: Lipoprotein (a) and coronary heart disease: Meta-analysis of prospective studies. *Circulation* 102: 1082–1085, 2000
358. Kronenberg F, Neyer U, Lhotta K, Trenkwalder E, Auinger M, Pribasnik A, Meisl T, Konig P, Dieplinger H: The low molecular weight apo(a) phenotype is an independent predictor for coronary artery disease in hemodialysis patients: a prospective follow-up. *J Am Soc Nephrol* 10: 1027–1036, 1999
359. Longenecker JC, Klag MJ, Marcovina SM, Liu YM, Jaar BG, *et al.* High lipoprotein (a) levels and small apolipoprotein (a) size prospectively predict cardiovascular events in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 16: 1794–1802, 2005
360. Sampol J, Dignat-George F. Thrombosis and endothelium activation and/or alteration. *Rev Iberoam Tromb Hemost* 1996;9:40
361. Eaton DL, Fless GM, Kohr WJ, McLean JW, Ku QT, *et al.* Partial amino acid sequence of apolipoprotein (a) shows that it is homologous to plasminogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3224
362. Miles LA, Dahlberg CM, Plow EF. The cell binding domains of plasminogen and their functions in plasma. *J Biol Chem* 1988;263:11928-34
363. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19:217-246
364. Jaar BG, Plantinga LC, Astor BC, *et al.* Novel and traditional cardiovascular risk factors for peripheral arterial disease incident-dialysis patients. *Adv Chronic Kidney Dis* 2007; 14(3):304-313
365. Viann AC, Mocelin AJ, Matsuo T, Morais-Filho D, Largura A, *et al.* Uremic hyperhomocystenemia: a randomized trial of folate treatment for the prevention of cardiovascular events. *Hemodial Int* 2007; 11(7):210-216
366. Price DT, Loscalzo J: Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 107:85-97, 1999
367. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, *et al.* Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001, 104(12):1336-1342
368. Bonomini M, Reale M, Santarelli P, Stuard S, Settefrati N, Albertazzi A: Serum levels of soluble adhesion molecules in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephron* 1998, 79(4):399-407
369. Rabb H, Calderon E, Bittle PA, Ramirez G. Alterations in soluble intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996, 27(2):239-243

370. Papagianni A, Dovas S, Bantis C, Belechri AM and Kalovoulos M. Carotid atherosclerosis and endothelial cell adhesion molecules as predictor of long-term outcome in chronic hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2008; 28(2): 265-274
371. Taha H, Was GPH, Kotlinowski J, Kozakowska M, Marek A, *et al.* Modulation of inflammatory response by pentoxifylline is independent of heme oxygenase-1 pathway. *J Physiol and Pharm* 2009; 60(2):3-12
372. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D and Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 1991; 88:1121-1127
373. Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK and Chi DS. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res*, 1999; 19:91-104
374. Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, *et al.* Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002; 22:115-120
375. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*, 1998; 2:275-281
376. Schecter AD, Rollins BJ, Zhang YJ, Charo IF, Fallon JT, *et al.* Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 28568-28573
377. McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, *et al.* CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2005; 112:1113-1120
378. Lin SL, Chen YM, Chen CT, Chiang WC, Tsai CC and Tsai TJ. Pentoxifylline attenuated the renal disease progression in rats with remnant kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002; 10:2916-2929
379. Neuner P, Klosner G, Pourmojib M, Knobler R, Schwarz T. Pentoxifylline in vivo and in vitro down-regulates the expression of the intercellular adhesion molecule-1 in monocytes. *Immunology* 1997; 90:435-439
380. Stompór T, Zdzenicka A, Motyka M, Dembinska-Kiec A, Davies SJ and Sulowicz W. Selected growth factors in peritoneal dialysis: their relationship to markers of inflammation, dialysis adequacy, residual renal function and peritoneal membrane transport. *Perit Dial Int* 2002; 22:670-676
381. Doi K, Noiri E and Fujita T. Role of vascular endothelial growth factor in kidney disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2010; 8(1):122-128
382. Sertic J, Slavicek J, Bozina N, Malenica B, Kes P and Reiner Z. Cytokines and growth factors in mostly atherosclerotic patients on hemodialysis determined by biochip array technology. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45(10):1347-1352

383. Werther K, Christensen IJ and Nielsen HJ. Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: significance of VEGF in various leucocytes and platelets. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62(5):343-350
384. Gaudry M, Br  gerie O, Andrieu V, Benna JE, Pocidalo MA and Hakim J. Intracellular Pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 1997; 90:4153-4161
385. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF: Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342:1350-1358
386. Grainer DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, *et al.* The serum concentration of active transforming growth factor β is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med* 1995; 1:74-79
387. Fr  steg  rd J, Ulfgr  n AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, *et al.* Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: Dominance of proinflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999; 145:33-43
388. Stefoni S, Cianciolo G, Donati G, Dormi A, Silvestri MG, *et al.* Low TGF- β 1 serum levels are a risk factor for atherosclerosis disease in ESRD patients. *Kidney Int* 2002; 61:324-335
389. Chen YM, Wu KD, Tsai TJ and Hsieh BS. Pentoxifylline inhibits PDGF-induced proliferation and TGF-beta-stimulated collagen synthesis by vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(4):773-783
390. Wahl S, Wen J, Moutsopoulos N (2006). «TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege». *Immunol Rev* 213: 213–227
391. Letterio J, Roberts A (1998). «Regulation of immune responses by TGF-beta». *Annu Rev Immunol* 16: 137–161
392. Hannink M, DJ Donoghue. "Estructura y funci  n del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y las prote  nas relacionadas". *Biochim Biophys. Acta* 1989 (1): 1-10.
393. Kumar, V. *Robbins y Coltran base patol  gica de la enfermedad*. China: Elsevier 2010: 88-89
394. Chiou YL, Shieh JJ and Lin CY. Blocking of Akt/NF-kappaB signaling by pentoxifylline inhibits platelet-derived growth factor-stimulated proliferation in Brown Norway rat airway smooth muscle cells. *Pediatr Res* 2006; 60(6): 657-62.
395. Lin SL, Chen RH, Chen YM, Chiang WC, Tsai TJ and Hsieh BS. Pentoxifylline inhibits platelet-derived growth factor-stimulated cyclin D1 expression in mesangial cells by blocking Akt membrane translocation. *Mol Pharmacol* 2003;64(4):811-822
396. Cattell V, Cook T, Moncada S. Glomeruli synthesize nitrite in experimental nephrotoxic nephritis. *Kidney Int* 1990; 38: 1056-1060
397. Barthlen W, Stadler J, Lehn NL, Miethke T, Bartels H, *et al.* Serum levels of end products of nitric oxide synthesis correlate positively with tumor necrosis factor alpha and negatively with body temperature in patients with postoperative abdominal sepsis. *Shock* 1994; 2(6): 398-401.

398. Djordjevic VB, Stojanovic I, Cosic V, Zvezdanovic L, Deljanin-Ilic M, *et al.* Serum neopterin, nitric oxide, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α levels in patients with ischemic heart disease. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(8): 1149-1455.
399. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Urabe Y, *et al.* Evidence of impaired endothelium-dependent coronary vasodilation in patients with angina pectoris and normal coronary angiograms. *N Engl J Med* 1993; 328:1659-1664
400. Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, Ruiz-Caravaca ML, Álvarez V, *et al.* Malnutrition-inflammation syndrome is associated with endothelial dysfunction in peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2003; 19: 240-245
401. Nandi J, Saud B, Zinkievich JM, Yang ZJ and Levine RA. TNF- α modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis. *Mol Cell Biochem* 2010; 336(1-2):17-24
402. Motawi TK, Darwish HA and Abd El Tawab AM. The relative efficacy of aminoguanidine and pentoxifylline in modulating endotoxin-induced cardiac stress. *Cell Biochem Funct* 2011, 10:1809 [Epub ahead of print]
403. Aguilera A, Codoceo R, Selgas R, Garcia P, Picornell M, *et al.* Anorexigen (TNF- α , cholecystokinin) and orexigen (neuropeptide Y) plasma levels in peritoneal dialysis (PD) patients: their relationship with nutritional parameters. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(6): 1476-1483
404. Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Ruiz Caravaca ML, Alvarez V, del Peso G, *et al.* Malnutrition-inflammation syndrome is associated with endothelial dysfunction in peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2003; 19: 240-245
405. Perunicic-Pekovic G, Pljesa S, Rasic-Milutinovic Z, Stankovic S, Ilic M and Maletic R. Inflammatory cytokines and malnutrition as related to risk for cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86(4):205-209.
406. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, *et al.* The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002; 168: 3536-3542
407. Rostaing L, Peres C, Tkaczuk J, Charlet JP, Bories P, Durand D, Ohayon E, de Preval C, Abbal M: Ex vivo flow cytometry determination of intracytoplasmic expression of IL-2, IL-6, IFN- γ , and TNF- α in monocytes and T lymphocytes, in chronic hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2000; 20: 18–26,
408. Mizia-Steck, Zahorska-Markiewicz B, Mandecki T, Janowska J, Szulc A, *et al.* Hyperlipidaemias and serum cytokines in patients with coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2003; 58(1): 9-15
409. Aznar-Salatti J, Escolar G, Cases A, Gómez-Ortiz G, Anton P, *et al.* Uraemic medium causes endothelial cell dysfunction characterized by an alteration of the properties of its subendothelial matrix. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10:2199-2204
410. Serradell M, Diaz-Ricart M, Cases A, Zurbano MJ, AznarSalatti J, *et al.* Uremic medium disturbs the hemostatic balance of cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost* 2001; 86:1099-1105

411. Carbo C, Arderiu G, Escolar G, Fusté B, Cases A, *et al.* Differential expression of proteins from cultured endothelial cells exposed to uremic versus normal serum. *Am J Kidney Dis* 2008; 51:603-612
412. Serradell M, Diaz-Ricart M, Cases A, Petriz J, Ordina A and Escolar G. Uraemic medium accelerates proliferation but does not induce apoptosis of endothelial cells in culture. *Nephrol Dial Transplant* 18:1079-1085, 2003
413. Barnes PJ: Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 29:867-870, 1997
414. Autieri MV, Yue TL, Ferstein GZ, Ohlstein E. Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B inhibit human vascular smooth muscle cell adherence and proliferation and prevent neointima formation in rat carotid arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;213:827-36
415. Boyle EM Jr, Kovacich JC, Canty TG Jr, Morgan EN, Chi E, *et al.* Inhibition of nuclear factor-kappa B nuclear localization reduces human E-selectin expression and the systemic inflammatory response. *Circulation* 1998; 98: II282-288
416. Marx J. How the glucocorticoids suppress immunity. *Science* 1995;270:232-3
417. Koop E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; 265:956-959
418. Hernández-Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Renedo G, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997;95: 1532-1541
419. Kim SY, Guijarro C, O'Donnell MP, Kasiske BL, Kim Y, Keane WF. Human mesangial cell production of monocyte chemoattractant protein-1: modulation by lovastatin. *Kidney Int* 1995;48:363-71
420. Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silvia P, Peralta AL, *et al.* Toll-like receptors are key participants in innate immune responses". *Biological research* 2007; 40(2):97-112
421. Hua Lu YC, Yeh WC, Ohashi S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 42:145-151
422. Katsargyris A, Theocharis SE, Tsiodras S, Giaginis K, Bastounis E, Klonaris C. Enhanced TLR4 endothelial cell immunohistochemical expression in symptomatic carotid atherosclerotic plaques. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14:1-10
423. Kim NY, Pae HO, Kim YC, Choi CK, Rim JS, *et al.* Pentoxifylline potentiates nitric oxide production in interleukin-1 β -stimulated vascular smooth muscle cells through cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. *Gen Pharmacol* 2000 35(4):205-211
424. Fraissinette AD, Berman B, Duncan MR, and Lefevre L. Effects of pentoxifylline on interferon-gamma (IFN γ) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) induction of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression on human normal keratinocytes and Langerhans cells. *Eur J Dermatol* 1992; 2:265

425. Neuner P, Klosner G, Pourmojib M, Knobler R and Schwarz. Pentoxifylline in vivo and in vitro down-regulates the expression of the intercellular adhesion molecule-1 in monocytes. *Immunology* 1997;90:435-439
426. Taha H, Was GPH, Kotlinowski J, Kozakowska M, Marek A, *et al.* Modulation of inflammatory response by pentoxifylline is independent of heme oxygenase-1 pathway. *J Physiol and Pharm* 2009; 60(2):3-12

APÉNDICES

APÉNDICE I:

FICHA TECNICA DE PENTOXIFILINA (PTX) POR AGEMED



agencia española
de medicamentos y
productos sanitarios

PENTOXIFILINA 400 mg comprimidos con cubierta pelicular

1. DENOMINACIÓN DEL MEDICAMENTO

ELORGAN 400 mg comprimido con cubierta pelicular

2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Un comprimido con cubierta pelicular de liberación retardada contiene:

400 mg de pentoxifilina

3. FORMA FARMACÉUTICA

Comprimido con cubierta pelicular

4. DATOS CLÍNICOS

4.1 Indicaciones terapéuticas

Arteriopatía ocliterante periférica; trastornos circulatorios de causa arterioesclerótica, diabética, inflamatoria o funcional; alteraciones tróficas; úlceras distales de las extremidades inferiores y gangrena.

4.2 Posología y forma de administración

La posología se orienta en función de la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la tolerancia de cada paciente individual. En general, se recomienda una dosis de 400 mg de pentoxifilina 2 ó 3 veces al día. **En pacientes con función renal disminuida**

(aclaramiento de creatinina inferior a 30 ml/min), es necesaria una reducción de la dosis de un 30 a un 50 %, en función de la tolerancia individual.

En pacientes con insuficiencia hepática grave, es necesaria una reducción de la dosis, en función de la tolerancia individual. En pacientes hipotensos o con circulación lábil así como en pacientes para los que una reducción de la presión arterial representa un riesgo especial (p.ej. pacientes con enfermedad cardíaca coronaria grave o estenosis de los vasos cerebrales), el tratamiento se iniciará con dosis bajas que se aumentarán de forma gradual.

4.3 Contraindicaciones

ELORGAN no se debe utilizar en pacientes con hipersensibilidad a la pentoxifilina, a otras metilxantinas o a cualquiera de los excipientes. Tampoco se administrará en caso de hemorragia grave o de hemorragia retiniana extensa (riesgo de aumento de la hemorragia) o bien de infarto de miocardio reciente.

4.4 Advertencias y precauciones especiales de empleo

Se requiere un especial control en:

- pacientes con arritmias cardíacas graves
- pacientes con infarto de miocardio anterior no reciente.
- pacientes hipotensos
- pacientes con insuficiencia renal grave (aclaramiento de creatinina inferior a 30 ml/min)
- pacientes con insuficiencia hepática grave
- Pacientes con riesgo de hemorragia debido a medicación anticoagulante o a trastornos de la coagulación (ver “contraindicaciones”)

No se dispone de experiencia del uso de ELORGAN en niños.

4.5 Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción

Uso con precaución:

- Anticoagulantes orales: aumento del riesgo hemorragia (mecanismo impreciso). Reforzar la vigilancia clínica. Controlar con más frecuencia los valores séricos de protrombina e INR (ver *4.4 Advertencias y precauciones especiales de empleo*).
- Antiagregantes plaquetarios: aumento del riesgo de hemorragia. Reforzar la vigilancia clínica. Controlar con más frecuencia el tiempo de hemorragia (tiempo de sangría) (ver *4.4 Advertencias y precauciones especiales de empleo*).
- Teofilina (base y sales) y aminofilina: aumento de la teofilina con riesgo de sobredosis (competición a nivel del metabolismo hepático de la teofilina) Vigilancia clínica y eventualmente determinación de la teofilinemia; si fuese necesario, adaptar la posología de la teofilina durante el tratamiento con pentoxifilina y tras su finalización.
- Antihipertensores y otros fármacos con potencial de reducción de la tensión arterial: La pentoxifilina puede potenciar el efecto hipotensor, por lo que se debe reforzar el control de la tensión arterial. En ningún caso esta especialidad puede sustituir el tratamiento específico de la hipertensión arterial.
- Insulina o antidiabéticos orales: La pentoxifilina puede potenciar el efecto hipoglucemiante por lo que se recomienda un estrecho control de los pacientes bajo tratamiento con medicación para la diabetes mellitus.

4.6 Embarazo y lactancia

No se recomienda la administración de ELORGAN durante el embarazo dado que no se dispone de suficiente experiencia de su uso en la gestación.

Pentoxifilina pasa a la leche materna en pequeñas cantidades. Dado que no se dispone de suficiente experiencia del uso de ELORGAN durante la lactancia, el médico deberá considerar los beneficios frente a los posibles riesgos, antes de la administración a mujeres en período de lactancia.

4.7 Efectos sobre la capacidad de conducir y utilizar máquinas

No se ha descrito ningún efecto negativo de ELORGAN sobre la capacidad para conducir vehículos o manejar maquinaria.

4.8 Reacciones adversas

Se pueden producir las siguientes reacciones adversas, en particular si se administra ELORGAN a dosis elevadas:

Trastornos gastrointestinales: Con frecuencia: opresión gástrica, sensación de plenitud, náuseas, vómitos o diarreas.

Trastornos cardíacos: Ocasionalmente: arritmias cardíacas (p.ej. taquicardia); Raramente: angina de pecho

Trastornos vasculares: Con frecuencia: sofocos; Raramente: caída de la presión arterial, en especial en pacientes con una tendencia aumentada a la hemorragia, hemorragias (p.ej. de la piel y/o de las mucosas de localización gástrica y/o intestinal).

Trastornos del sistema nervioso: Ocasionalmente: vértigo, cefaleas, agitación y alteraciones del sueño. En casos aislados: meningitis aséptica.

Trastornos hepáticos: En casos aislados, colestasis intrahepática y elevación de las transaminasas.

Trastornos del sistema inmunitario: Ocasionalmente: reacciones de hipersensibilidad como prurito, eritema y urticaria; En casos aislados: reacciones anafilácticas / anafilactoides con edema angioneurótico, broncoespasmo y en algunos casos shock. (Cuando se observen los primeros síntomas de reacción anafiláctica / anafilactoide se interrumpirá inmediatamente la administración de ELORGAN y se instaurarán las medidas oportunas).

Trastornos hematológicos: En casos aislados: trombopenia.

4.9 Sobredosificación

Síntomas de sobredosificación

Como consecuencia de la sobredosificación con pentoxifilina pueden aparecer inicialmente náuseas, vértigo, taquicardia o una caída en la presión arterial.

Adicionalmente se pueden producir síntomas tales como fiebre, agitación, sofocos, arreflexia, convulsiones tónico-clónicas, eritema, pérdida del conocimiento y vómitos en poso de café, como síntoma indicativo de hemorragia gastrointestinal.

Tratamiento de la sobredosificación

No se conoce ningún antídoto específico. En caso de que la ingestión acabe de producirse se intentará evitar la absorción sistémica del principio activo mediante la eliminación del fármaco (p.ej. efectuando un lavado gástrico) o bien retrasando su absorción (p.ej. administrando carbón activo) o combinando ambos procedimientos.

El tratamiento de la sobredosificación aguda y la prevención de sus complicaciones pueden requerir un control médico general e intensivo así como medidas terapéuticas específicas.

5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

5.1 Propiedades farmacodinámicas

La pentoxifilina aumenta la deformabilidad eritrocitaria alterada, inhibe la agregación eritrocitaria y la plaquetaria, disminuye los niveles de fibrinógeno, inhibe la adhesividad de los leucocitos al endotelio, inhibe la activación leucocitaria y las consiguientes alteraciones endoteliales y disminuye la viscosidad hemática. Con ello, la pentoxifilina favorece la perfusión microcirculatoria a través de un aumento de la fluidez de la sangre y de sus efectos antitrombóticos. Puede disminuir ligeramente la resistencia periférica cuando se administra pentoxifilina a altas dosis o mediante infusión rápida. La pentoxifilina ejerce un leve efecto inotrópico positivo sobre el corazón. Algunos ensayos clínicos sugieren que parámetros relacionados con el tratamiento sintomático de los desórdenes cerebrales crónicos, pudieran mejorar en pacientes tratados con pentoxifilina en determinadas circunstancias.

5.2 Propiedades farmacocinéticas

Tras la administración oral, la pentoxifilina se absorbe de forma rápida y prácticamente completa. Tras su absorción, la pentoxifilina experimenta un metabolismo de "primer paso". La biodisponibilidad absoluta del fármaco inalterado

es del $19 \pm 13\%$. El principal metabolito activo 1-(5-hidroxihexil)-3,7-dimetilxantina (metabolito I) se detecta en el plasma a una concentración equivalente al doble de la de la sustancia original, con la que se halla en equilibrio bioquímico de oxidación-reducción reversible. Por este motivo, la pentoxifilina y el metabolito I se pueden considerar como una unidad activa y por consiguiente, la disponibilidad del principio activo es considerablemente superior. La vida media de eliminación de la pentoxifilina tras administración oral o intravenosa es de aproximadamente 1,6 horas. La pentoxifilina se metaboliza por completo y se elimina en más del 90% por vía renal, en forma de metabolitos polares hidrosolubles no conjugados. En pacientes con insuficiencia renal grave, la excreción de metabolitos se halla retrasada. En pacientes con trastornos de la función hepática, la vida media de eliminación de pentoxifilina se prolonga y se incrementa la biodisponibilidad.

5.3 Datos preclínicos sobre seguridad

Toxicidad aguda

En estudios relativos a la toxicidad aguda se hallaron valores de la DL50 de 195 y 1385 mg/kg de peso corporal en ratón por vía i.v. y p.o., respectivamente y de 230 y 1770 mg/kg de peso corporal en rata por vía i.v. y p.o., respectivamente. Ello significa que la toxicidad de la pentoxifilina es baja.

Toxicidad crónica

En estudios de toxicidad crónica no se detectaron lesiones orgánicas tóxicas debidas a la sustancia, después de la administración oral de pentoxifilina durante 1 año en ratas, con una dosis diaria de hasta 1000 mg/kg de peso corporal y en perros, a una dosis diaria de hasta 100 mg/kg de peso corporal. Con dosis diarias de 320 mg/kg de peso corporal o superiores, administradas durante 1 año, algunos perros mostraron falta de coordinación, insuficiencia circulatoria, hemorragias, edemas pulmonares o células gigantes en testículos.

Toxicidad en la reproducción

Se observó un incremento en el número de muertes intrauterinas en ratas a las que se administraron dosis extremadamente elevadas. No obstante los estudios de reproducción

en ratones, ratas, conejos y perros, no generaron ninguna evidencia de teratogenicidad, embriotoxicidad o trastorno en la fertilidad o en el desarrollo perinatal.

Mutagenicidad

Los estudios de mutagenicidad (test de Ames, test de micronúcleo y test de UDS) no evidenciaron ningún efecto mutagénico.

Potencial neoplásico

En ratones tratados con dosis orales de pentoxifilina de hasta 450 mg/kg de peso corporal al día, durante 18 meses, no se evidenciaron indicaciones de efecto carcinogénico alguno. En ratas hembra tratadas con dosis orales de pentoxifilina de hasta 450 mg/kg de peso corporal al día, durante 18 meses, se observó un aumento en el número de fibroadenomas mamarios de naturaleza benigna. No obstante, los fibroadenomas mamarios benignos son de frecuente aparición espontánea en ratas viejas.

6. DATOS FARMACÉUTICOS

6.1 Relación de excipientes

Hidroxietilcelulosa, polivinilpirrolidona, talco, estearato de magnesio, hipromelosa, dióxido de titanio E171, polietilenglicol 8000, eritrosina E127

6.2 Incompatibilidades

No se han descrito

6.3 Período de validez

Cinco años

6.4 Precauciones especiales de conservación

No requiere condiciones especiales de conservación

6.5 Naturaleza y contenido del recipiente

Envase con 60 comprimidos con cubierta pelicular de 400 mg

Envase clínico con 500 comprimidos con cubierta pelicular de 400 mg

6.6 Instrucciones de uso y manipulación

Ver apartado “Posología y forma de administración”

6.7 Nombre o razón social y domicilio permanente del titular de la autorización de

Comercialización

SANOFI AVENTIS, S.A.

Josep Plá, 2

08019- Barcelona

6.8 Condiciones de dispensación

Sin receta médica

APENDICE II:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA SUJETOS SANOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EVALUAR EL EFECTO DE PENTOXIFILINA SOBRE EL ESTADO MICROINFLAMATORIO SISTEMICO EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRONICA EN DIALISIS:

INTRODUCCIÓN. Usted ha sido invitado a participar en este proyecto de investigación que se realizará en el HULP. Antes de aceptar participar en este estudio, es importante que usted lea y entienda la siguiente información.

¿EN QUÉ CONSISTE ESTE ESTUDIO? La enfermedad cardiovascular es la causa más importante de muerte en pacientes con insuficiencia renal crónica terminal, sin y con diálisis (*diálisis peritoneal o hemodiálisis*). En los últimos años se ha observado una estrecha relación entre la presencia inflamación sistémica y la enfermedad cardiovascular (aterosclerosis acelerada). Para los pacientes en diálisis sería de gran utilidad encontrar algún tratamiento que disminuya la inflamación, permitiendo que nuestros pacientes vivan más y mejor. Desgraciadamente aún no contamos con un tratamiento efectivo para este fin. Cabe mencionar que para evaluar el estado inflamatorio de los pacientes participantes se necesita la participación de sujetos sanos.

EL OBJETIVO DE ESTE ESTUDIO ES: Nuestro objetivo consiste en evaluar si el efecto de éste fármaco mejora el estado inflamatorio condicionado por la misma enfermedad en los pacientes participantes con insuficiencia renal crónica.

¿QUÉ TENDRÉ QUE HACER SI QUIERO PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO? Si finalmente decide participar, el presente consentimiento que su médico le ha proporcionado tendrá que ser firmado por usted.

PROCEDIMIENTOS. Si usted reúne los criterios y desea participar en este estudio, dicha participación consistirá exclusivamente en la obtención de una muestra sanguínea adicional (30 ml), a la extracción realizada en su analítica programada como control de rutina de su estado de salud.

VISITAS. Se le pedirá que asista como habitualmente se la ha indicado en ayuno (sólo de alimentos, no de medicamentos) de no menos de 8 horas para la extracción de sus muestras de sangre.

¿CUÁLES SON LOS POSIBLES RIESGOS DE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO? La obtención de las muestras de sangre no ha de representar riesgos adicionales para su salud.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS DE PARTICIPAR EN ÉSTE ESTUDIO? El participar en éste estudio no significa que tendrá un trato preferencial, pero el beneficio potencial de su participación en este estudio es que se encuentre una forma segura y efectiva para disminuir el estado inflamatorio de los pacientes con insuficiencia renal. Además, contribuirá al conocimiento médico que redundará en una mejor comprensión y tratamiento de este tipo de pacientes.

REMUNERACIÓN POR SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO. No existe ninguna remuneración económica por su participación en este estudio, ni tampoco para ninguno de los investigadores participantes en el mismo, pues este proyecto será realizado sin ánimo de lucro y con el único objeto del beneficio de los conocimientos adquiridos y encaminado exclusivamente a mejorar las condiciones de morbi-mortalidad de la insuficiencia renal crónica.

El investigador principal se comprometerá a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que se plantee por motivo de esta investigación.

Los investigadores de éste estudio darán la seguridad a los participantes de que no se les identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con su privacidad serán manejados en forma confidencial de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y las medidas de seguridad en el tratamiento de la información conforme al R.D. 1720/2007 y, aunque los resultados sean publicados, no se revelará su identidad, pudiendo ejercer en su caso los derechos de acceso, cancelación, rectificación y/u oposición al estudio. Cabe mencionar que a las muestras obtenidas sólo tendrán acceso los investigadores implicados en el presente estudio, serán etiquetadas con un código asignado por el investigador y almacenadas en la Unidad de Biología Molecular del Hospital Universitario de La Princesa.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EVALUAR EL EFECTO DE PENTOXIFILINA SOBRE EL ESTADO MICROINFLAMATORIO SISTEMICO EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRONICA EN DIALISIS:

El Dr. _____ me ha explicado exhaustivamente los objetivos que este estudio persigue, lo que demanda mi participación, las complicaciones y ventajas que tendré. Me han entregado además información adicional en relación al mismo. Me ha dado una copia informativa. He tenido tiempo de despejar todas mis dudas y hacer cualquier tipo de preguntas.

Por todo ello, Yo Don/a: _____, con DNI/PAS no. _____, doy mi consentimiento para que se me extraigan una muestra de sangre adicional (30 ml), coincidentes con mi analítica ya programada, y se utilice en el presente estudio. Se me explica además que los resultados serán manejados de forma anónima guardando toda la confidencialidad del caso. Finalmente se me explica que los resultados serán utilizados única y exclusivamente con fines de investigación, que en caso de negarme a participar, ésta decisión no influirá en ningún momento en los cuidados médicos o de enfermería, y que en futuras ocasiones puedo negarme y retirarme del estudio, sin dar explicaciones.

Para que conste donde sea oportuno, firmo la presente en Madrid, a los _____ días del mes de _____ del 20 ____.

Fdo. _____

D. _____ DNI: _____

Testigo

Fdo. _____

D. _____ DNI: _____

SI DESEA MÁS INFORMACIÓN SOBRE ÉSTE TEMA PUEDE CONSULTAR LOS INVESTIGADORES PRINCIPALES DEL PROYECTO, DRA. LILIANA GONZÁLEZ ESPINOZA¹, EL DR. ABELARDO AGUILERA PERALTA¹, O A LA DRA. GUILLERMINA BARRIL², ADSCRITOS TANTO A LA UNIDAD DE BIOLOGÍA MOLECULAR¹ Y AL SERVICIO DE NEFROLOGÍA² DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PRINCESA, AL TELÉFONO: 91-5202200 EXTENSIÓN 3296.

APENDICE III:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES CON IRCT EN DIALISIS

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EVALUAR EL EFECTO DE PENTOXIFILINA SOBRE EL ESTADO MICROINFLAMATORIO SISTÉMICO EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRONICA EN DIALISIS

INTRODUCCIÓN. Usted ha sido invitado a participar en este proyecto de investigación que se realizará en el HULP. Antes de aceptar participar en este estudio, es importante que usted lea y entienda la siguiente información.

¿EN QUÉ CONSISTE ESTE ESTUDIO? La enfermedad cardiovascular es la causa más importante de muerte en pacientes con insuficiencia renal crónica terminal, sin y con diálisis (*diálisis peritoneal o hemodiálisis*). En los últimos años se ha observado una estrecha relación entre la presencia de inflamación sistémica y la enfermedad cardiovascular (aterosclerosis acelerada). Para los pacientes en diálisis sería de gran utilidad encontrar algún tratamiento que disminuya la inflamación, permitiendo que nuestros pacientes vivan más y mejor. Desgraciadamente aún no contamos con un tratamiento efectivo para este fin.

EL OBJETIVO DE ESTE ESTUDIO ES: Aprovechando que su Nefrólogo le va a prescribir la *pentoxifilina* (según la ficha técnica del fármaco), nuestro objetivo consiste en evaluar si el efecto de éste fármaco mejora su estado inflamatorio condicionado por la misma enfermedad.

¿QUÉ TENDRÉ QUE HACER SI QUIERO PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO? Si finalmente decide participar, el presente consentimiento que su médico le ha proporcionado tendrá que ser firmado por usted. Por otro lado además de comprometerlo a usted como paciente, compromete al personal sanitario y a la institución a brindarle toda la información pertinente y a darle apoyo logístico necesario para la realización del estudio.

PROCEDIMIENTOS. Si usted reúne los criterios y desea participar en este estudio, la duración del mismo es de 4 meses con 3 evaluaciones bioquímicas totales, que se realizarán en intervalos bimestrales y consistirán exclusivamente en la obtención de una muestra sanguínea adicional (30 ml), a la extracción realizada para su estudios de rutina.

VISITAS. Se le pedirá que asista en ayuno (sólo de alimentos, no de medicamentos) de no menos de 8 horas para la extracción de sus muestras de sangre. En caso de que su tratamiento farmacológico actualmente recibido fuera modificado por indicación médica durante el periodo de estudio (4 meses) es importante que nos lo comunique a la brevedad.

¿CUÁLES SON LOS POSIBLES RIESGOS DE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO? El presente es un estudio en el que se aprovechará el que esté usted consumiendo un medicamento que necesite por diferente razón a este proyecto, el cual está aprobado por la Agencia Española del Medicamento y ampliamente utilizado en otras áreas médicas, con escasos efectos adversos reportados; y por otro lado la obtención de las muestras de sangre, coincidentes con su seguimiento habitual, no ha de representar riesgos adicionales para su salud.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS DE PARTICIPAR EN ÉSTE ESTUDIO? El participar en éste estudio no significa que tendrá un trato preferencial, pero el beneficio potencial de su participación en este estudio es que se encuentre una forma segura y efectiva para disminuir su estado inflamatorio como beneficio añadido a la indicación por la cual lo está usted consumiendo. Además, contribuirá al conocimiento médico que redundará en una mejor comprensión y tratamiento de los pacientes con insuficiencia renal en diálisis.

REMUNERACIÓN POR SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO. No existe ninguna remuneración económica por su participación en este estudio, ni tampoco para ninguno de los investigadores participantes en el mismo, pues este proyecto será realizado sin ánimo de lucro y con el único objeto del beneficio de los conocimientos adquiridos y encaminado exclusivamente a mejorar las condiciones de morbi-mortalidad de la insuficiencia renal crónica.

El investigador principal se comprometerá a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que se plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier asunto relacionado con la investigación.

Los pacientes participantes en el presente estudio conservarán el derecho de retirarse del mismo en cualquier momento en que lo consideren conveniente, sin que ello afecte la atención médica que reciban en el hospital.

Los investigadores de éste estudio darán la seguridad a los participantes de que no se les identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de

que los datos relacionados con su privacidad serán manejados en forma confidencial de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y las medidas de seguridad en el tratamiento de la información conforme al R.D. 1720/2007 y, aunque los resultados sean publicados, no se revelara su identidad, pudiendo ejercer en su caso los derechos de acceso, cancelación, rectificación y/u oposición al estudio. Cabe mencionar que a las muestras obtenidas sólo tendrán acceso los investigadores implicados en el presente estudio, serán etiquetadas con un código asignado por el investigador y almacenadas en la Unidad de Biología Molecular del Hospital Universitario de La Princesa.

Si durante el estudio aparece información que pueda afectar la voluntad de los participantes de continuar en el mismo, serán oportunamente informados.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EVALUAR EL EFECTO DE PENTOXIFILINA SOBRE EL ESTADO MICROINFLAMATORIO SISTÉMICO EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRONICA EN DIALISIS:

El Dr. _____ me ha explicado exhaustivamente los objetivos que este estudio persigue, lo que demanda mi participación, las complicaciones y ventajas que tendré. Me han entregado además información adicional en relación al mismo. Me ha dado una copia informativa. He tenido tiempo de despejar todas mis dudas y hacer cualquier tipo de preguntas.

Por todo ello, Yo Don/a: _____, con DNI/PAS no. _____, doy mi consentimiento para que se me extraiga una muestra de sangre adicional (30 ml), coincidentes con los exámenes de rutina del Servicio de Nefrología, y se utilice en el presente estudio. Se me explica además que los resultados serán manejados de forma anónima guardando toda la confidencialidad del caso. Finalmente se me explica que los resultados serán utilizados única y exclusivamente con fines de investigación, que en caso de negarme a participar, ésta decisión no influirá en ningún momento en los cuidados médicos o de enfermería, y que en futuras ocasiones puedo negarme y retirarme del estudio, sin dar explicaciones.

Para que conste donde sea oportuno, firmo la presente en Madrid, a los _____ días del mes de _____ del 20 ____.

Fdo. _____

D. _____ DNI: _____

Testigo

Fdo. _____

D. _____ DNI: _____

SI DESEA MÁS INFORMACIÓN SOBRE ÉSTE TEMA PUEDE CONSULTAR LOS INVESTIGADORES PRINCIPALES DEL PROYECTO, DRA. LILIANA GONZÁLEZ ESPINOZA¹, EL DR. ABELARDO AGUILERA PERALTA¹, O A LA DRA. GUILLERMINA BARRIL², ADSCRITOS TANTO A LA UNIDAD DE BIOLOGÍA MOLECULAR¹ Y AL SERVICIO DE NEFROLOGÍA² DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PRINCESA, AL TELÉFONO: 91-5202200 EXTENSIÓN 3296.

APÉNDICE IV:

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y BIOQUÍMICOS

No. de paciente: _____ Grupo de tratamiento: SANO _ IRCT _

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS CLÍNICOS

FICHA CLÍNICA:

1^{er} Apellido: _____ 2^o Apellido: _____

Nombre: _____.

Fecha de recolección de datos: ____/____/____.

N.H.C: _____ Hospital: _____ Fecha nacimiento: ____/____/____.

Sexo: H ☐ M ☐ Estado civil: S ☐ C ☐ V ☐ D ☐ Sp ☐

Domicilio: _____ N^o: _____ Piso: _____

Localidad: _____ C.P. _____ Provincia: _____

Tel. _____ Móvil: _____

Edad (años): ____ Peso seco: ____ (kg) Talla: ____ (m) IMC: ____ (kg/m²)

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS:

Etiología de IRCT: _____ Biopsia: _____.

Fecha de Dx. IRCT: ____/____/____.

Tratamiento sustitutivo renal:

Fecha de inicio en DP: ____/____/____. Duración (meses): _____.

Tipo de Técnica de DP: DPA ☐ DPCA ☐

Fecha de Inicio de HD: ____/____/____. Duración (meses): _____.

Tipo de acceso vascular: FAVI ☐ Catéter ☐ Dializador: _____.

Tiempo de sesión de HD: _____ no. sesiones por semana: _____.

Tratamiento actual:

Dosis de rHuEPO (u/kg/sem): _____.

Otros comórbidos:

DM: Sí ☐ No ☐ **Tipo:** 1 ☐ 2 ☐ **Fecha de Dx.:** ____/____/____.

Tratamiento actual (fármaco, dosis y tiempo de utilización):

_____.

_____.

_____ **.HTA:**

Si ☐ **No** ☐ **Fecha de Dx.:** ____/____/____.

Tratamiento actual (fármaco, dosis y tiempo de utilización):

_____.

_____.

_____.

1) _____ **Fecha Dx.:** ____/____/____.

Tratamiento actual (fármaco, dosis y tiempo de utilización):

_____.

_____.

_____.

2) _____ **Fecha Dx.:** ____/____/____.

Tratamiento actual (fármaco, dosis y tiempo de utilización):

_____.

_____.

_____.

3) _____ **Fecha Dx.:** ____/____/____.

Tratamiento actual (fármaco, dosis y tiempo de utilización):

_____.

_____.

_____.

4) _____ **Fecha Dx.:** ____/____/____.

Tratamiento actual (fármaco, dosis y tiempo de utilización):

_____.

_____.

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICO Y BIOQUÍMICOS

Fecha: _____ No. de Evaluación: BASAL (0) _ FINAL (4) _

VARIABLES	meses		
CLINICAS	0	-	-
Peso seco (Kg)			
Talla (cm)			
Kt/V _{urea} (sesión)			
TAS (mmHg)			
TAD (mmHg)			
LABORATORIO	0	2	4
Hemoglobina (g/dl)			
Hematocrito (%)			
Leucocitos (miles/mm ³)			
Monocitos totales (miles/mm ³)			
Monocitos totales (%)			
Hierro (µg/dl)			
Vitamina B12 (pg/ml)			
Ac. Fólico (ng/ml)			
Glucosa (mg/dl)			
Urea (mg/dl)			
Creatinina sérica (mg/dl)			
Colesterol total (mg/dl)			
Triglicéridos (mg/dl)			
Colesterol HDL (mg/dl)			
Colesterol LDL (mg/dl)			
Albúmina sérica (g/dl)			
Prealbúmina (mg/dl)			
Ca (mg/dl)			
P (mg/dl)			
Fe (mg/dl)			
Transferrina (µg/dl)			
PTH-intacta (pg/ml)			
MARCADORES DE INFLAMACION	0	-	4
CD16+ (L x 10 ³ /µl)			
IL-6 (pg/ml)			
TNF-α (pg/ml)			
PCR (mg/L)			
IL-10 pg/ml)			
Fetuina A (g/l)			
CITOCINAS EN SOBRENADANTE DE CD16+	0	-	4
IL-6 (pg/ml)			
TNF-α (pg/ml)			
MARCADORES DE DISFUNCION ENDOTELIAL	0	-	4
t-PA / NO ₃			
PAI-1 (ng/ml)			
TM (ng/ml)			
Lp(a) (mg/dl)			
Hcy (µmol/l)			
VCAM-1 (pg/ml)			
MCP-1 (pg/ml)			
VEGF (pg/ml)			
TGF-β (pg/ml) / PDGF (pg/ml)			

APENDICE V: CARTA DE APROBACION DEL COMITÉ DE ETICA



Hospital Universitario
de La Princesa

Comunidad de Madrid

COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Madrid, 29 de mayo de 2009

El Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de la Princesa en su reunión del día 28-05-09 (acta 10/09) ha evaluado el proyecto de investigación:

TÍTULO: Efecto de la pentoxifilina sobre los parámetros de microinflamación sistémica en el estado urémico y su evolución en diálisis.

Nº de Registro: PI-372


Investigador principal: Liliana González Espinoza (U. Biología Molecular)

Investigador colaborador: Abelardo Aguilera (Sº de Nefrología)

Ponentes: F. Abad

Decisión tomada: Aprobación (28-05-09)

Este Comité Ético de Investigación Clínica considera que tanto el proyecto de investigación como la hoja de información al paciente son **ética y metodológicamente aceptables**. Así mismo, considera que los investigadores son competentes para llevar a cabo este proyecto.


Fdo: **Dra. M. Mar Ortega Gómez**
Secretaría del C.E.I.C.

Original Article

Pentoxifylline decreases serum levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and C-reactive protein in hemodialysis patients: results of a randomized double-blind, controlled clinical trial

Liliana González-Espinoza¹, Enrique Rojas-Campos¹, Miguel Medina-Pérez², Patricia Peña-Quintero², Benjamin Gómez-Navarro² and Alfonso M. Cueto-Manzano¹

¹Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Renales, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, México and ²Departamento de Nefrología, Unidad de Hemodiálisis, Hospital de Especialidades, CMNO, IMSS, Guadalajara, México

Correspondence and offprint requests to: Alfonso M. Cueto-Manzano; E-mail: a_cueto_manzano@hotmail.com

Abstract

Aim. The aim of this study was to compare the effect of pentoxifylline versus placebo on serum concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) of hemodialysis (HD) patients. **Methods.** This is a randomized double-blind, controlled clinical trial. HD patients without infection or drugs with anti-inflammatory effect were randomly allocated to a study ($n = 18$, pentoxifylline 400 mg/day) or control ($n = 18$, placebo) group; all patients had arteriovenous fistula. Besides clinical and laboratory monthly assessments, serum TNF- α and IL-6 (ELISA) and CRP (nephelometry) were measured at 0, 2 and 4 months. **Results.** All the inflammation markers significantly ($P < 0.05$) decreased in the pentoxifylline group: TNF- α [baseline 0.4 (0–2) versus final 0 (0–0) pg/mL], IL-6 [baseline 9.4 (5–14) versus final 2.9 (2–5) pg/mL] and CRP [baseline 7.1 (3–20) versus final 2.6 (1–8) mg/L], whereas no significant changes were observed in the placebo group: TNF- α [baseline 0 (0–0) versus final 1.2 (0–4) pg/mL], IL-6 [baseline 8.0 (5–11) versus final 8.7 (4–11) pg/mL] and CRP [baseline 4.5 (2–9) versus final 3.8 (3–23) mg/L]. **Conclusions.** Pentoxifylline significantly decreased serum concentrations of TNF- α , IL-6 and CRP compared to placebo. Pentoxifylline could be a promising and useful strategy to reduce the systemic inflammation frequently observed in patients on HD.

Keywords: CRP; hemodialysis; IL-6; pentoxifylline; TNF- α

Introduction

Chronic inflammation is strongly linked to atherosclerosis, cardiovascular disease and malnutrition in patients with end-stage renal disease (ESRD) [1–3]. Moreover, mortality in this kind of patients is almost nine times higher than for

the general population and largely caused by atherosclerotic cardiovascular disease [2–4].

Etiology of inflammation in renal disease is multiple and includes uremia *per se*, comorbidities, renal replacement therapy and hidden infections, among others [5]. Patients on hemodialysis (HD) display the highest level of inflammation, probably due to exposure to endotoxin and other pollutants, bioincompatible dialysis solution and dialysis membrane [5, 6].

Therapeutic interventions targeting chronic inflammation in HD patients may lead to improved outcomes. Some therapeutic agents are being studied in early clinical trials, while others could become viable alternatives in the future [7]. Pentoxifylline, a non-selective phosphodiesterase inhibitor could be an effective alternative in patients with kidney failure. This drug has been extensively studied in animal models and humans without kidney disease, and its antithrombotic and hemorheologic properties are well established [8]. In addition, pentoxifylline has been shown *in vitro* and *in vivo* to down-regulate the expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-8 [9, 10]. Pentoxifylline also increases anti-inflammatory IL-10 [11, 12]. However, there is little data about the anti-inflammatory effect of pentoxifylline in patients with kidney disease, and particularly, no randomized clinical trial has evaluated this drug in HD.

Size and duration of clinical end-point trials required to establish benefit of treatment regimens have become daunting; instead, some biomarkers are used as potential surrogates of cardiovascular risk [13]. Therefore, this study was designed to compare the effect of pentoxifylline versus placebo on serum concentrations of TNF- α , IL-6 and C-reactive protein (CRP) in patients on HD.

Materials and methods

This was a randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial, performed in a tertiary-care teaching hospital (Hospital de Especialidades, CMNO, IMSS) in Guadalajara, Mexico, from January 2006 to May 2008.

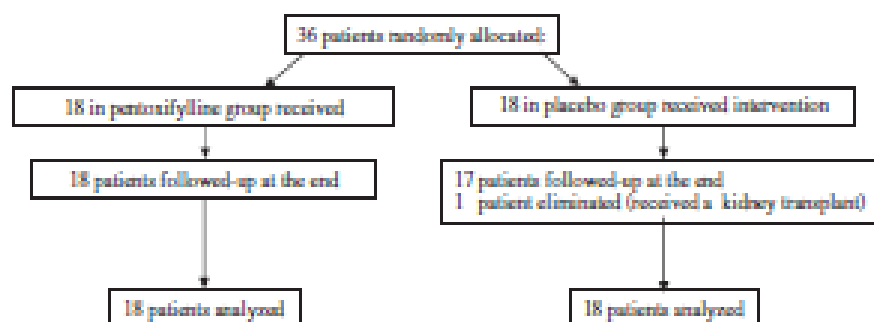


Fig. 1. Flow diagram summarizing recruitment and follow-up of patients.

A flow diagram summarizing recruitment and follow-up of patients is shown in Figure 1. From the total 105 patients attending the HD unit at our hospital, 36 were selected by simple random sampling. If patients met the selection criteria, they were invited to participate in the study. Inclusion criteria were age ≥ 18 years, ≥ 2 months on HD, arteriovenous fistula as vascular access and endorsement of informed consent. Patients were excluded if they had inflammatory causes of ESRD, liver disease, cancer, AIDS, any infectious disease 2 months before the study, failed kidney graft, hypersensitivity to pentoxifylline or other methylxanthines, hemorrhagic/clotting disorders, risk for worsening pre-existing cardiac arrhythmias or arterial hypotension or treatment with antibiotics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, steroids, immunosuppressives, statins or pentoxifylline 3 months previous to the study.

Once included (after a written consent was obtained), patients were randomly allocated (by a computer-generated randomization list) to a study or control group. Over a period of 4 months, patients of the study group received one pentoxifylline tablet (400 mg) orally once a day (at dinner time), whereas controls received one identical starch tablet on the same schedule. Pentoxifylline dose was selected based on previous pharmacological and clinical studies about the use of this drug in patients with renal impairment [14, 15].

All patients had three HD sessions per week, with the same kind of single-use dialysis membrane (cellulose triacetate; Nipro Corporation, Osaka, Japan) and dialysate (bicarbonate 35 mEq/L, calcium 2.5 mEq/L, potassium 2 mEq/L). Ultrafiltration dialysate was checked by triplicate every month, using agar plates at 37°C for at least 3 days; results were 0.1 CFU/mL throughout the study.

Monthly visits were scheduled for clinical and biochemical evaluations. Once any current infection was excluded, a blood sample was taken at baseline and every month for measurement of complete blood count, urea, creatinine, glucose, albumin, lipids and electrolytes (measured by usual methods). In serum samples at 0, 2 and 4 months, TNF- α and IL-6 concentrations were measured by ELISA, using high-sensitivity kits (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Additionally, in the same serum samples, CRP concentrations were measured by nephelometry, using high-sensitivity kits (Dade Behring, Marburg, Germany) in a Nephelometry Analyser II (Dade Behring). Lower detection limit was 0.3 pg/mL for TNF- α , 0.1 pg/mL for IL-6 and 0.1 mg/L for CRP; when a result was lower than these limits, it was considered as zero. In previous studies, [16] inter- and intra-assay variations were 3.4 and 3.4% for CRP, 3.9 and 4.6% for IL-6 and 2.8 and 6% for TNF- α , respectively. Dialysis dose was measured as equilibrated Kt/V_{urea} [17] at 0 and 4 months. All laboratory measurements, including inflammation markers, were performed by the same personnel in the Central Laboratory (Hospital de Especialidades, CMNO). All patients, personnel and investigators, including the persons responsible for data management and statistics, were blinded to the treatment assignment. The code was opened only after recruitment and data collection of all patients had been completed.

Treatment compliance was recorded by counting tablets left in the container at the end of each monthly visit.

The study was approved by the Institutional Review Board (Hospital de Especialidades, CMNO, No. R-2006-1301-38) and registered in the US National Institutes of Health (NCT01269827).

Statistical analysis

A *a priori* sample size was calculated considering a reduction of 50% on CRP levels currently found in our setting (5.3 ± 1.9 mg/L; Angul-Zúñiga JR, Rojas Campos E, Martín-del-Campo F, Carrasco R, Nave D and

Custo-Marciano AM, unpublished data) as well as the effect of pentoxifylline on TNF- α previously reported in non-dialysis patients [15]. Using a formula for testing proportion differences in clinical trials [18], considering 80% confidence level, alpha 0.05 and 20% of possible losses to follow-up, sample size was established as 18 subjects per group. Results are shown as mean \pm SD or median (percentiles 25–75%) in case of dimensional variables, and as number or percentages in case of nominal variables, as appropriate. Inter-group comparisons were analyzed by Mann-Whitney U-test or Fisher's exact tests, as appropriate. Friedman test was used for intra-group comparisons of dimensional variables. McNemar test was used to compare baseline versus final evaluations of nominal variables and Wilcoxon test to compare results of adequacy of dialysis. A two-tailed $P < 0.05$ was accepted as significant, but the exact value is preferentially shown.

Results

In general, intermediate evaluations (1, 2 and 3 months) were in agreement with final results (4 months); however, to simplify data presentation, only baseline and final results are shown. Adherence to treatment was 99% in both groups during the whole study.

From the 18 patients in control group, 1 patient received a kidney transplant and was removed from the study but not from the analysis.

There were no significant differences between groups regarding demographic and clinical variables at baseline (Table 1).

Table 2 shows comparisons of clinical- and dialysis-related variables between groups at the beginning and the end of the study. Equilibrated Kt/V_{urea} was higher in the control group since the beginning of the study; however, all its measurements were within recommended values in both groups. No other difference in these variables was observed between groups.

Results of biochemical variables are shown in Table 3. Serum albumin and phosphorus were significantly lower in controls at the end of the follow-up compared to patients in the study group. Although non-significant, patients of the study group tended to decrease serum triglycerides at final evaluation, contrary to the observed in controls. No other biochemical variable displayed significant differences neither for inter- nor intra-group comparisons.

Comparisons of the inflammation markers

Figure 2 displays results of the inflammation markers in both groups. Median serum concentrations of TNF- α , IL-6 and CRP significantly decreased in the study group at the end of the follow-up, whereas they remained roughly the same or increased in the control group.

No serious adverse event was observed in any of the groups throughout the study.

Discussion

This is the first randomized double-blind, controlled clinical trial of the effect of pentoxifylline on systemic inflammation

Table 1. Comparison of baseline clinical and demographic variables between groups

Variable	Study	Control	P
N	18	18	
Age (years)	31.4 ± 12.9	39.2 ± 14.6	0.67
Male sex, N (%)	14 (78)	11 (61)	0.47
Cause of ESRD, N (%)			
Unknown	11 (62)	9 (52)	
Type 2 diabetes mellitus	1 (5)	3 (15)	0.19
Other	6 (33)	6 (33)	
Time on HD (years)	4.0 (3–5)	4.5 (3–6)	0.28
Concomitant medication, N (%)			
Furosemide	6 (33)	3 (17)	0.22
Telmisartan	5 (28)	2 (11)	0.20
Metoprolol	6 (33)	3 (17)	0.50
Nifedipine	6 (33)	5 (28)	0.22
Furosemide	4 (22)	4 (22)	0.65
Vitamin B complex	9 (50)	10 (56)	0.50
Folic acid	8 (44)	10 (56)	0.37
Calcium carbonate	12 (67)	12 (67)	0.64
Calcitriol	3 (17)	4 (22)	0.50
Ferrous fumarate	4 (22)	3 (17)	0.50

Table 2. Comparison of clinical- and dialysis-related variables at the beginning and the end of the study*

Variable	Study		Control	
	Baseline	Final	Baseline	Final
Post-dialysis weight (kg)	65 ± 1.8	63 ± 1.9	60 ± 1.2	60 ± 1.2
Body mass index (kg/m ²)	23.7 ± 5.8	23.2 ± 6.1	22.0 ± 2.4	22.0 ± 2.5
Systolic BP (mmHg)	137 ± 3.1	137 ± 2.6	144 ± 2.5	135 ± 2.2
Diastolic BP (mmHg)	78 ± 1.7	72 ± 1.6	76 ± 1.5	72 ± 1.1
rHuEPO dose (IU/kg)	50 (0–60)	50 (0–60)	50 (47–60)	50 (0–60)
Equilibrated Kt/V _{urea} (per session)	1.15 ± 0.4	1.16 ± 0.3	1.47 ± 0.5*	1.39 ± 0.3

*rHuEPO, recombinant erythropoietin; BP, blood pressure.

*P < 0.05 versus the same evaluation in the study group.

Table 3. Comparison of biochemical variables at the beginning and the end of the follow-up

Variable	Study		Control	
	Baseline	Final	Baseline	Baseline
Hemoglobin (g/dL)	10.6 ± 1.8	9.6 ± 1.9	10.7 ± 2.1	10.5 ± 2.7
Leukocytes (×1000/μL)	6.3 ± 1.8	5.1 ± 2.0	5.3 ± 1.7	4.9 ± 1.6
Glucose (mg/dL)	89.8 ± 25.6	91.9 ± 24.1	85.7 ± 27.3	95.0 ± 43.9
Urea (mg/dL)	135 ± 41	139 ± 51	140 ± 35	128 ± 56
Creatinine (mg/dL)	11.6 ± 5.5	11.3 ± 2.6	10.9 ± 2.4	9.4 ± 3.7
Albumin (g/dL)	4.3 ± 0.6	4.3 ± 0.3	4.0 ± 0.4	3.9 ± 0.8*
Total cholesterol (mg/dL)	140 ± 36	130 ± 29	150 ± 45	139 ± 34
HDL cholesterol (mg/dL)	33.4 ± 7.4	35.0 ± 8.5	40.7 ± 12.8	39.8 ± 10.8
Triglycerides (mg/dL)	177 (91–251)	142 (103–189)	97 (79–161)	115 (86–138)
Corrected calcium (mg/dL)	9.4 ± 1.5	9.2 ± 1.5	9.3 ± 1.5	9.5 ± 1.1
Phosphorus (mg/dL)	6.3 ± 2.2	6.0 ± 1.2	5.8 ± 1.6	4.7 ± 2.0*

*P < 0.05 versus the same evaluation in the study group.

of HD patients. Results showed that pentoxifylline decreases the inflammatory cascade, as measured by the serum levels of TNF-α, IL-6 and CRP, compared to placebo.

Pentoxifylline inhibits phosphodiesterase, resulting in an increase of intracellular cyclic adenosine monophosphate activity and down-regulation of pro-inflammatory cytokine synthesis such as TNF-α, IL-6 and interferon-γ [9, 10]; this drug also inhibits proliferation of peripheral blood mononuclear cell, adherence to the cell matrix and endothelium and T and natural killer cell cytotoxicity [12, 19]. Pentoxifylline inhibits synthesis of the inflammation markers at a transcriptional level [9, 10], which may represent an advantage over other anti-cytokine drugs, for example etanercept, which only stabilizes TNF-α and hence leads to accumulation in peripheral circulation [20].

In association with their anti-inflammatory effects, pentoxifylline may reduce mortality and/or morbidity in pre-term neonates with sepsis, necrotizing enterocolitis and chronic lung disease [10, 21], achieve some successes in alcoholic liver disease [22], reduce acute side effects and late sequelae of radiation oncology [23] and have beneficial effects on multiple surrogate inflammation and clinical markers of chronic heart failure [19, 20]. On the other hand, few studies have been published in patients with kidney disease, and unfortunately, not many of high quality [24]. In uremic rats, pentoxifylline treatment prevented the increase in serum concentrations of inflammation and oxidative stress markers induced by high sodium intake [25]. In humans, this drug was effective in reducing proteinuria of diabetic patients with

No serious adverse event was observed in any of the groups throughout the study.

Discussion

This is the first randomized double-blind, controlled clinical trial of the effect of pentoxifylline on systemic inflammation

of HD patients. Results showed that pentoxifylline decreases the inflammatory cascade, as measured by the serum levels of TNF- α , IL-6 and CRP, compared to placebo.

Pentoxifylline inhibits phosphodiesterase, resulting in an increase of intracellular cyclic adenosine monophosphate activity and down-regulation of pro-inflammatory cytokine synthesis such as TNF- α , IL-6 and interferon- γ [9, 10]; this drug also inhibits proliferation of peripheral blood mononuclear cell, adherence to the cell matrix and endothelium and T and natural killer cell cytotoxicity [12, 19]. Pentoxifylline inhibits synthesis of the inflammation markers at a transcriptional level [9, 10], which may represent an advantage over other anti-cytokine drugs, for example etanercept, which only stabilizes TNF- α and hence leads to accumulation in peripheral circulation [20].

In association with their anti-inflammatory effects, pentoxifylline may reduce mortality and/or morbidity in pre-term neonates with sepsis, necrotizing enterocolitis and chronic lung disease [10, 21], achieve some successes in alcoholic liver disease [22], reduce acute side effects and late sequelae of radiation oncology [23] and have beneficial effects on multiple surrogate inflammation and clinical markers of chronic heart failure [19, 20]. On the other hand, few studies have been published in patients with kidney disease, and unfortunately, not many of high quality [24]. In uremic rats, pentoxifylline treatment prevented the increase in serum concentrations of inflammation and oxidative stress markers induced by high sodium intake [25]. In humans, this drug was effective in reducing proteinuria of diabetic patients with

Table 1. Comparison of baseline clinical and demographic variables between groups

Variable	Study	Control	P
N	18	18	
Age (years)	31.4 \pm 12.9	39.2 \pm 14.6	0.67
Male sex, N (%)	14 (78)	11 (61)	0.47
Cause of ESRD, N (%)			
Unknown	11 (62)	9 (52)	
Type 2 diabetes mellitus	1 (5)	3 (15)	0.19
Other	6 (33)	6 (33)	
Time on HD (years)	4.0 (3–5)	4.5 (3–6)	0.28
Concomitant medication, N (%)			
Furosemide	6 (33)	3 (17)	0.22
Telmisartan	5 (28)	2 (11)	0.20
Metoprolol	6 (33)	3 (17)	0.50
Nifedipine	6 (33)	5 (28)	0.22
Furosemide	4 (22)	4 (22)	0.65
Vitamin B complex	9 (50)	10 (56)	0.50
Folic acid	8 (44)	10 (56)	0.37
Calcium carbonate	12 (67)	12 (67)	0.64
Calcitriol	3 (17)	4 (22)	0.50
Ferrous Fumarate	4 (22)	3 (17)	0.50

Table 2. Comparison of clinical- and dialysis-related variables at the beginning and the end of the study^a

Variable	Study		Control	
	Baseline	Final	Baseline	Final
Post-dialysis weight (kg)	65 \pm 1.8	63 \pm 1.9	60 \pm 1.2	60 \pm 1.2
Body mass index (kg/m ²)	23.7 \pm 5.8	23.2 \pm 6.1	22.0 \pm 2.4	22.0 \pm 2.5
Systolic BP (mmHg)	137 \pm 31	137 \pm 26	144 \pm 25	135 \pm 22
Diastolic BP (mmHg)	78 \pm 1.7	72 \pm 1.6	76 \pm 1.5	72 \pm 1.1
rhEPO dose (U/kg)	50 (0–60)	50 (0–60)	50 (47–60)	50 (0–60)
Equilibrated Kt/V _{urea} (per session)	1.15 \pm 0.4	1.16 \pm 0.3	1.47 \pm 0.5*	1.39 \pm 0.3

^arhEPO, recombinant erythropoietin; BP, blood pressure.

*P < 0.05 versus the same evaluation in the study group.

Table 3. Comparison of biochemical variables at the beginning and the end of the follow-up

Variable	Study		Control	
	Baseline	Final	Baseline	Baseline
Hemoglobin (g/dL)	10.6 \pm 1.8	9.6 \pm 1.9	10.7 \pm 2.1	10.5 \pm 2.7
Leukocytes ($\times 1000/\mu\text{L}$)	6.3 \pm 1.8	5.1 \pm 2.0	5.3 \pm 1.7	4.9 \pm 1.6
Glucose (mg/dL)	89.8 \pm 25.6	91.9 \pm 24.1	85.7 \pm 27.3	95.0 \pm 43.9
Urea (mg/dL)	135 \pm 41	139 \pm 51	140 \pm 35	128 \pm 56
Creatinine (mg/dL)	11.6 \pm 5.3	11.3 \pm 2.6	10.9 \pm 2.4	9.4 \pm 3.7
Albumin (g/dL)	4.3 \pm 0.6	4.3 \pm 0.3	4.0 \pm 0.4	3.9 \pm 0.8*
Total cholesterol (mg/dL)	140 \pm 36	130 \pm 29	150 \pm 45	139 \pm 34
HDL cholesterol (mg/dL)	33.4 \pm 7.4	35.0 \pm 8.5	40.7 \pm 12.8	39.8 \pm 10.8
Triglycerides (mg/dL)	177 (91–251)	142 (103–189)	97 (79–161)	115 (86–138)
Corrected calcium (mg/dL)	9.4 \pm 1.5	9.2 \pm 1.5	9.3 \pm 1.5	9.5 \pm 1.1
Phosphorus (mg/dL)	6.3 \pm 2.2	6.0 \pm 1.2	5.8 \pm 1.6	4.7 \pm 2.0*

*P < 0.05 versus the same evaluation in the study group.

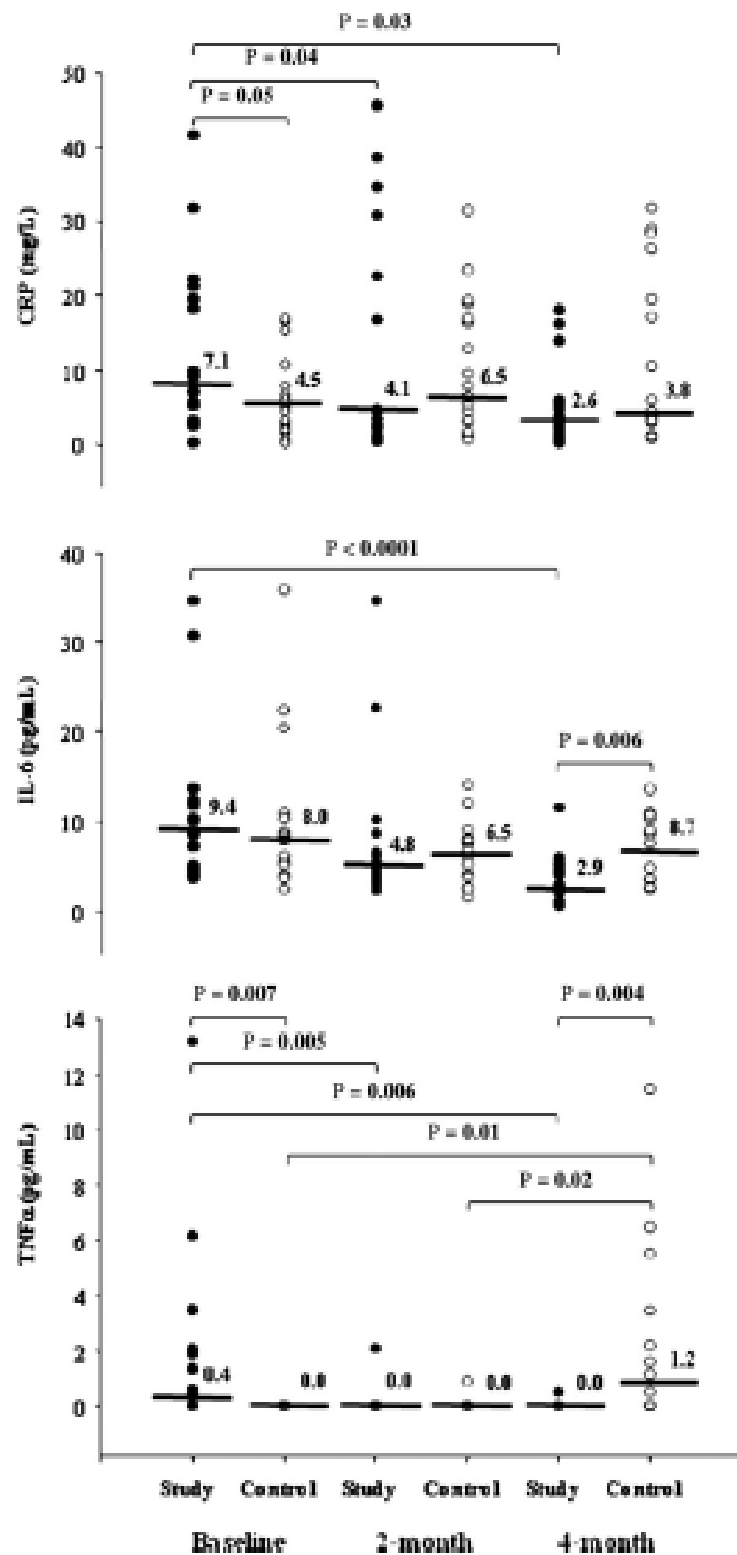


Fig. 2. Comparison of the inflammatory markers between groups. Horizontal bars are median values.

advanced renal failure, which was strongly correlated with reduction in serum concentrations of TNF- α [15]. In a small case series study [26], eight patients on HD and four on peritoneal dialysis with recombinant human erythropoietin-resistant anemia were treated with pentoxifylline; after 4 months, this drug significantly improved the hemoglobin response coincidentally with inhibition of TNF- α and interferon gamma production. In our patients, hemoglobin levels were not different between groups; this issue, however, cannot be appropriately evaluated in the present study as erythropoietin dose was not controlled by researchers, and its use is still a matter with local economical implications. Two other findings that may add support to the anti-inflammatory effect of pentoxifylline are the better preservation of serum albumin and the trend to decrease serum triglycerides in the study group compared to controls [27].

On the other hand, most of the patients included in both groups had an unknown cause of ESRD, which is a common finding in our setting [16, 28]; however, none of them had a suspected inflammatory etiology. Variables related to HD procedure that could potentially affect inflammation results [29–31] were controlled in the current study, as all patients were treated with the same dialysis solution, vascular access and length of HD session. Although to a significantly lesser extent compared with bioincompatible membranes, cellulose triacetate membranes may still activate complement and cause cytokine production, neutropenia, phagocytotic and oxygen species production alterations [29]. This methodological problem was sorted out in our study as patients in both groups were treated with the same kind of hemodialyzers. Lower dose of dialysis may be associated with higher inflammation [31]; however, this was not the case in the present study as patients treated with pentoxifylline received lower dose of dialysis (within recommended levels [32]) and had the lower levels of inflammatory markers at the end of the follow-up. Overhydration, implicated in the genesis of inflammation [31] was also controlled as patients in both groups had similar ultrafiltration rates and post-dialysis weight throughout the study. Moreover, several comorbid conditions (arterial hypertension, obesity, and diabetes mellitus), also implicated in inflammation [33–35], were not significantly different between groups.

Treatment compliance of 99% in both groups and similar conditions for measurement of inflammatory markers strengthen our results. However, the presence of hidden infections (*Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, chronic periodontal disease) as cause of inflammation [36] may be regarded as a possible limitation. Although the latter infections were not investigated with a more in-depth laboratory evaluation, they were clinically discarded with a meticulous physical examination and clinical chart revision; randomization could have also helped to solve this problem. Sample size could be considered too small to find differences between groups; however, it was calculated *a priori* (80% confidence level, alpha 0.05) to find a 50% reduction in CRP and TNF- α serum concentrations. Further studies with larger numbers of patients will help to support our findings. Follow-up may seem to be short; however, according to the pharmacology of pentoxifylline and results from previous studies, 4 months seem to be enough time to observe an effect on inflammation markers.

Conclusions

Pentoxifylline progressively and significantly reduced serum levels of TNF- α , IL-6 and CRP compared to placebo. This drug could be a promising and useful strategy to reduce the systemic inflammation frequently observed in patients with ESRD on HD, which may potentially have an effect on cardiovascular complications, but that needs to be investigated separately.

Acknowledgement. We thank the invaluable assistance of nurses Petra Ardians-Arellano, Elizabeth Nájera and María A. Villalobos-Acimbula as well as the laboratory assistance of Adolfo Cota-Sánchez. Finally, we are indebted with Dr. Abdardo Aguilera for his kind revision of the manuscript.

Funding. Fondo de Fomento a la Investigación (No. 2006-1A-J-007).

Conflict of Interest Statement. None declared.

References

1. Ikizler TA, Wingard RL, Harvell J *et al*. Association of morbidity with markers of nutrition and inflammation in chronic hemodialysis patients: a prospective study. *Kidney Int* 1999; 55: 1945–1951.
2. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome—the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 (Suppl 11): 28–31.
3. Wanner C, Zimmermann J, Schwaller S *et al*. Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients. *Kidney Int* 2002; 61 (Suppl 80): S99–S102.
4. The United States Renal Data System. *Annual Data Report*. 2010. <http://www.urds.org/> (15 September 2010 date last accessed).
5. Vitek DJ. Inflammation in renal disease. *Am J Cardiol* 2006; 97 (Suppl 1): 20A–27A.
6. Schindler R, Boenisch O, Fischer C *et al*. Effect of the hemodialysis membrane on the inflammatory reaction *in vivo*. *Clin Nephrol* 2000; 53: 452–459.
7. Kowdly CP, Kalantar-Zadeh K. Novel targets and new potential developments in the treatment of inflammation in chronic kidney disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 451–467.
8. Scherer RH. Antithrombotic potential of pentoxifylline. A hemorrhologically active drug. *Angiology* 1985; 36: 387–398.
9. Neuner P, Kleiner G, Schauer E *et al*. Pentoxifylline *in vivo* down-regulates the release of IL-1b, IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor- α by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology* 1994; 83: 262–267.
10. Harris E, Schulkin SM, Patole SE. Pentoxifylline in preterm neonates. A systematic review. *Pediatr Drugs* 2010; 12: 301–311.
11. Marchkiewicz J, Grabowska A, Lasterbach R *et al*. Differential effects of pentoxifylline, a non-specific phosphodiesterase inhibitor, on the production of IL-10, IL-12 p40 and p35 subunits by murine peritoneal macrophages. *Immunopharmacology* 2000; 49: 335–343.
12. Fernandez JL, de Oliveira RTD, Marmori RL *et al*. Pentoxifylline reduces pro-inflammatory and increases anti-inflammatory activity in patients with coronary artery disease—a randomized placebo-controlled study. *Atherosclerosis* 2008; 196: 434–442.
13. Tardif JC, Heikonen T, Orlhoff D *et al*. Vascular biomarkers and surrogate in cardiovascular disease. *Circulation* 2006; 113: 2936–2942.
14. Paup CM, Simpson KS, Horton MW *et al*. Multiple-dose pharmacokinetics of pentoxifylline and its metabolites during renal insufficiency. *Ann Pharmacother* 1996; 30: 724–729.
15. Navarro FJ, Mora C, Rivera A *et al*. Urinary protein excretion and serum tumor necrosis factor in diabetic patients with advanced renal failure: effects of pentoxifylline administration. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 458–463.
16. Ordaz-Molina SM, González-Pascencia J, Martín del Campo F *et al*. Is systemic inflammation of hemodialysis patients improved with the use of enalapril? Results of a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *ASBIO J* 2010; 56: 37–41.

17. Maduell F, García-Valderrama J, García H *et al*. Validation of different methods to calculate Kt/V considering post-dialysis rebound. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1928–1933.
18. Jayasankar L, Rao PS. Methods of determining sample sizes in clinical trials. *Indian Pediatr* 1989; 26: 115–121.
19. Shaw SM, Shah MKH, Williams SG *et al*. Immunological mechanisms of pentoxifylline in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 113–118.
20. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present and foreseeable future. *Circ Res* 2002; 91: 988–998.
21. Haque KN, Mohan P. Pentoxifylline for treatment of sepsis and necrotizing enterocolitis in neonates. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2003, (2). Art. No.: CD004205. DOI: 10.1002/14651858.CD004205.
22. Tilg H, Day CP. Management strategies in alcoholic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 34–34.
23. Nisler C, Zimmermann FB, Adam M *et al*. The role of pentoxifylline as a modifier of radiation therapy. *Cancer Treat Rev* 2005; 31: 448–455.
24. McCormick BB, Sydor A, Alchami A *et al*. The effect of pentoxifylline on proteinuria in diabetic kidney disease: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2008; 52: 454–463.
25. Gallardo JM, de Carmen Prado UM, Acosta D *et al*. Inflammation and oxidative stress markers by pentoxifylline treatment in rats with chronic renal failure and high sodium intake. *Arch Med Res* 2007; 38: 34–38.
26. Cooper A, Mikhail A, Lathbridge MW *et al*. Pentoxifylline improves haemoglobin levels in patients with erythropoietin-resistant anaemia in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1877–1882.
27. Kayan GA. Biochemistry and biomarkers of inflamed patients: why look, what to assess. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4 (Suppl 1): S56–S63.
28. Cueto-Manzano AM, Quintana-Pérez E, Correa-Rotter R. Long-term CAPD survival and analysis of mortality risk factors: 12-year experience of a single center. *Perit Dial Int* 2001; 21: 148–153.
29. Hölzl WH. Hemodialysis membranes: interkinetic, biocompatibility, and middle molecules. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (Suppl 1): S62–S71.
30. Mavigli E, Brunori G, Camerini C *et al*. The kind of vascular access influences the baseline inflammatory status and epoetin response in chronic hemodialysis patients. *Blood Purif* 2006; 24: 387–393.
31. Zorn L, Zorn M, Falop T *et al*. Treatment time, chronic inflammation, and hemodynamic stability: the overlooked parameters in hemodialysis quantification. *Semin Dial* 2008; 21: 395–400.
32. KDOQI Guidelines. Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations: 2006 updates, Hemodialysis Adequacy. http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_cuphd_jd_VA/hd_rsc2.htm (15 September 2010, date last accessed).
33. Mariash R. Vascular endothelial growth factor: a missing link between hypertension and inflammation? *Hypertension* 2004; 44: 253–254.
34. Peto K, Mousavi J, Hoffmann U *et al*. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham heart study. *Circulation* 2007; 116: 1234–1241.
35. Pradhan A, Manson J, Rifai N *et al*. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286: 327–334.
36. Cueto-Manzano A, González-Espinoza L, Martín del Campo F. Inflammation in peritoneal dialysis: a Latin-American perspective. *Perit Dial Int* 2007; 27: 347–352.

Received for publication: 15.2.11; Accepted in revised form: 30.8.11